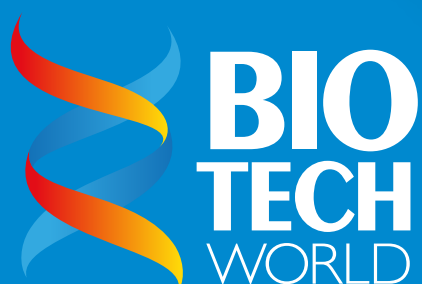


МАТЕРИАЛЫ КОНГРЕССА
CONGRESS PROCEEDINGS



МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:
СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ
РАЗВИТИЯ**

INTERNATIONAL CONGRESS

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

25 - 27 ФЕВРАЛЯ 2019
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4

25 - 27 FEBRUARY 2019
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW

БИОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ, ОБОРУДОВАНИЕ И РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ **LIFE SCIENCES**

- для культур клеток
- биохимии
- молекулярной биологии
- молекулярной генетики
- микробиологии

- сыворотки животных
- антитела
- рекомбинантные белки



HIMEDIA

abcam

Promega



MERCK

CORNING

nunc

Duchefa
BIOCHEMIE B.V.

PEPROTECH
OUR SUPPORT. YOUR DISCOVERY

CYGNUS
TECHNOLOGIES

CheMatech
macrocyclic design technologies

BostonBiochem

riboPharm

Avanti
POLAR LIPIDS, INC.

Abnova

AbD Serotec
A Bio-Rad Company

Miltenyi Biotec

MyBioSource.com

biotechne

R&D SYSTEMS
a biotechne brand

TOCRIS
a biotechne brand

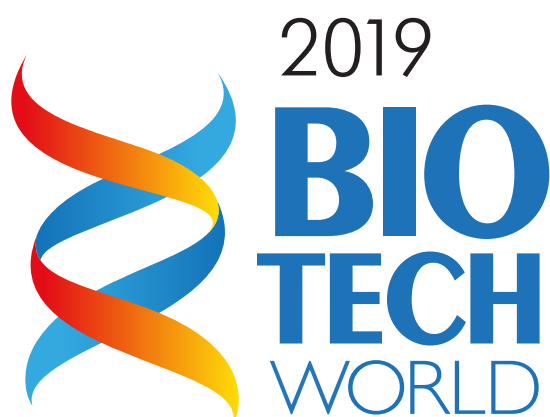
NOVUS
BIOLOGICALS
a biotechne brand

biowest

Мы можем предоставить демоверсии приборов в вашу лабораторию!

Москва, 115230, Каширское шоссе, д. 9, корп. 3. +7 (495) 728 4192, bio@chimmed.ru
Санкт-Петербург, 195248, просп. Энергетиков, д. 19, оф. 314. +7 (812) 605 0061, spb@chimmed.ru
Казань, 420081, ул. Седова, д. 22. +7 (843) 273 6761, 272 9786, kazan@chimmed.ru
Новосибирск, 630090, просп. Академика Лаврентьева, 6/1. +7 (383) 335 6108, sibir@chimmed.ru

ХИММЕД
www.chimmed.ru



WWW.BIOMOS.RU

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:
СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ
РАЗВИТИЯ**

ВЫПУСК 17

25 - 27 ФЕВРАЛЯ 2019
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4

INTERNATIONAL CONGRESS

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

ISSUE 17

25 - 27 FEBRUARY, 2019
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW

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

Материалы международного конгресса
«Биотехнология: состояние и перспективы
развития»
25 - 27 ФЕВРАЛЯ 2019 Г.

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

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

УДК 575.1/2::612.017.1 ББК 28.072
ISBN 978-5-9909118-0-2
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 конгресса
«Биотехнология: состояние и перспективы
развития»

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

The proceedings of International congress
«Biotechnology: state of the art and perspectives»
FEBRUARY 25 - 27, 2019.

DISCLAIMER

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

Opinions expressed may not necessarily reflect the
position of the Scientific Council of congress.

Information in the Biotechnology: state of the art and
perspectives» 2019 Congress Proceedings is subject
to change without notice. No part of this book may
be reproduced or transmitted in any form or by any
means, electronic or mechanical, for any purpose,
without the express written permission of the
International Scientific Council of congress.

ISBN 978-5-9909118-0-2
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 congress «Biotechnology: state of
the art and perspectives».

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

Организационный комитет / Organizing Committee	3 / 4
Программный комитет / Program Committee	5 / 8
Материалы конгресса	
1. Геномная инженерия / Genetic engineering	
Биотехнология и геномная инженерия, в том числе геномное редактирование, в сельскохозяйственной отрасли / Biotechnology, gene engineering and genome editing in agroindustry	9
Протеом человека - взгляд в будущее / Human proteomics. Looking into the future.....	45
2. Биотехнология и медицина / Biotechnology and medicine	
Биоматериалы в биотехнологиях и медицине / Biomaterials in biotechnology and medicine	64
Внеклеточные везикулы и циркулирующие микроРНК / Extracellular vesicles and circulating microRNA	140
Иммунная биотехнология / Immune biotechnology	163
Нанобиотехнологии в медицине / Nanobiotechnologies in medicine.....	195
Нейробиология и нейрореабилитация / Neurobiology and brain restoration	249
3. Биофарма / Biopharmaceutics	
Международный симпозиум «Инновационные решения в биотехнологии и фармацевтике» / International symposium «Innovations in biotechnology and pharmaceutics»	253
Надлежащие практики в разработке и исследовании биотехнологических лекарственных препаратов: возможности, экспертиза и вызовы (в условиях быстро меняющегося мира) / Development and research good practice of biotechnological pharmacies - possibilities, expertise and challenges in rapidly changing world	287

Симпозиум «Вакцины нового поколения» / Symposium «New generations vaccines»	304
4. Биоинформатика и IT / Bioinformatics and IT	
Большие массивы данных / Big data	331
5. Биоэкономика / Bioeconomics	
Биоаналитическая химия в современной диагностике и биотехнологии / Bioanalytic chemistry in modern diagnostics and biotechnology	393
Биогеотехнология / Biogeotechnology	440
Биокатализ и биокаталитические технологии / Biocatalysis and technologies	458
Пищевые биотехнологии / Sitology	494
Биологическая трансформация загрязнений в окружающей среде: закономерности и практические аспекты / Biological transformations of contaminants in the natural environment: patterns and practical aspects	589
Подготовка высококвалифицированных кадров в области биотехнологии / Training of highly qualified specialists in biotechnology	617

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

Быков Валерий Алексеевич	академик РАН, советник Президиума РАН, главный научный сотрудник Всероссийского института лекарственных растений, председатель Организационного комитета
Арчаков Александр Иванович	академик РАН, научный руководитель Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, сопредседатель Оргкомитета
Чехонин Владимир Павлович	академик РАН, вице-президент РАН, сопредседатель Программного комитета
Алешников Владимир Евгеньевич	руководитель конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и выставки «Мир биотехнологии-2019», ответственный секретарь Оргкомитета
Иванов Виктор Петрович	Президент Российского союза химиков
Лисица Андрей Валерьевич	академик РАН, профессор, директор Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича
Кирпичников Михаил Петрович	академик РАН, член Президиума РАН, декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Лисицын Андрей Борисович	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
Тихонович Игорь Анатольевич	академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии», И.о. декана Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров
Цыб Сергей Анатольевич	к.э.н., первый зам.министра Минпромторга РФ
Чойнзонов Евгений Лхамацыренович	академик РАН, директор Томского НИМЦ

ORGANIZING COMMITTEE

Valery A. Bykov	Academician of RAS, National Institute of Medicinal Plants, Chair of the Organizing Committee
Alexander I. Archakov	Academician of RAS, Academic adviser, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Co-Chair of the Organizing Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician of RAS, vice-president of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Vladimir Y. Aleshnikov	Executive Secretary of the Organizing Committee
Victor P. Ivanov	President, Russian Union of Chemists
Andrey V. Lisitsa	Academician of RAS, professor, Director of V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
Mikhail P. Kirpichnikov	Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
Andrey B. Lisitsyn	Academician of RAS, Academic adviser of Gorbатов FGBNU VNIIMP, Russian Academy of Agriculture
Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, Academic adviser of National Research Institute of Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agriculture, St. Petersburg
Sergey A. Tsyb	PhD (Economics), Deputy Minister of Industry and Trade of the Russian Federation
Eugene L. Choinzonov	Academician of RAS, Director, Tomsk National Research Medical Center

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

Варфоломеев Сергей Дмитриевич	член-корр. РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
Чехонин Владимир Павлович	академик, вице-президент РАН, сопредседатель Программного комитета
Арчаков Александр Иванович	академик РАН, научный руководитель Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, сопредседатель Оргкомитета
Яненко Александр Степанович	д.б.н., профессор, директор НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика, сопредседатель Программного комитета
Лисица Андрей Валерьевич	академик РАН, профессор, директор Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
Алешников Владимир Евгеньевич	директор конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и выставки «Мир биотехнологии-2019», ответственный секретарь Оргкомитета
Васильев Андрей Валентинович	профессор, д.б.н., член-корреспондент РАН, директор Института Биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
Власов Валентин Викторович	академик РАН, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
Градова Нина Борисовна	профессор, д.б.н., кафедра биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева
Дзантиев Борис Борисович	профессор, Институт биохимии им. А.Н.Баха
Евтушенко Евгений Геннадьевич	ассистент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Егоров Алексей Михайлович	академик РАН, профессор, заведующий лабораторией инженерной энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Зиновьева Наталия Анатольевна	академик РАН, научный руководитель ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Клячко Наталья Львовна	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ
Колчанов Николай Александрович	академик РАН, директор Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
Красильников Игорь Викторович	д.б.н., профессор, заместитель директора по инновациям и международным отношениям ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, г. Санкт-Петербург
Курочкин Илья Николаевич	д.х.н., профессор, директор Института биохимической
Легонькова Ольга Александровна	д.т.н., зав. лабораторией ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России

Лисицын Андрей Борисович	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
Мартынов Александр Игоревич	к.м.н., первый заместитель директора ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Медведев Вадим Викторович	к.э.н., директор департамента специальных программ, развития государственных научных центров и наукоградов Минобрнауки
Меньшутина Наталья Васильевна	профессор, директор Российско-Швейцарского учебно-научного центра трансфера фармацевтических биотехнологий, РХТУ имени Д.И. Менделеева
Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, декан факультета Биотехнологии МГУ им. М.В. Ломоносова
Нетесов Сергей Викторович	член-корр. РАН, проректор по научной работе Новосибирского Государственного Университета, г. Новосибирск
Овчинникова Татьяна Владимировна	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
Орешкин Евгений Николаевич	первый вице-президент консорциума "Биомак", заместитель декана биологического факультета МГУ по инновациям
Панфилов Виктор Иванович	профессор, зав. кафедрой биотехнологии, РХТУ имени Д.И. Менделеева
Попов Владимир Олегович	член-корр. РАН, директор Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Поройков Владимир Васильевич	профессор, заведующий отделом биоинформатики Институт биомедицинской химии им.В.Н. Ореховича
Потапкин Владимир Александрович	директор Департамента химико-технологического и лесопромышленного комплекса Минпромторга РФ
Римарева Любовь Вячеславовна	академик РАН, д.т.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ ВНИИПБТ
Седельникова Галина Васильевна	профессор, заместитель директора Центрального научно-исследовательского геологоразведочного института цветных и благородных металлов
Титов Евгений Иванович	академик РАН, заведующий кафедрой Технологии и биотехнологии продуктов питания животного происхождения МГУПП
Тихонович Игорь Анатольевич	академик РАН, научный руководитель ФГБНУ ВНИИСХМ
Хамитов Равиль Авгатович	генеральный директор ООО «МБЦ «Генериум»
Харитонов Владимир Дмитриевич	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИ молочной промышленности
Цыганов Дмитрий Игоревич	д.т.н., профессор, Министерство науки и образования РФ
Шестибратов Константин Александрович	к.б.н., руководитель группы лесной биотехнологии Филиала ИБХ, г. Пущино

PROGRAM COMMITTEE

Sergey D. Varfolomeyev	Corresponding Member of RAS, Research Head of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Chair of the Program Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician of RAS, vice-president of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Alexander I. Archakov	Academician of RAS, Academic Leader of Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, Co-Chair of the Organizing Committee
Alexander S. Yanenko	Grand PhD (Biology), Professor, Director of FGUP GosNIIGenetika State Research Center, Co-Chair of the Program Committee
Andrey V. Lisitsa	Academician of RAS, professor, Director of V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
Vladimir Y. Aleshnikov	Executive Secretary of the Organizing Committee
Nina B. Gradova	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Boris B. Dzantiev	Professor, A.N. Bach Institute of Biochemistry
Yevgeny G. Evtushenko	teaching assistant Sub-Department of Chemical Enzymology of Chemistry Department, Moscow State University
Alexey M. Yegorov	Academician of RAS, Professor, Head of Engineering Enzymology Laboratory, Chemical Department, Lomonosov Moscow State University
Natalia A. Zinovyeva	Academician of RAS, Academic adviser of Ernst FGBNU VIZh, Dubrovitsy
Vladimir D. Kharitonov	Academician of RAS, FGBNU National Institute of Dairy Industry
Nikolay A. Kolchanov	Academician of RAS, Director of FGBUN Institute of Cytology and Genetics, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Igor V. Krasilnikov	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director for Innovations and International Relations, FGUP SPbNIIVS, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg
Natalia L. Klyachko	Grand PhD (Chemistry), Professor, Head of Sub-Department of Chemical Enzymology of Chemistry Department, Moscow State University, deputy director of MSU Nanotechnology Education and Research Center
Ilya N. Kurochkin	Grand PhD (Chemistry), Professor, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Chair of Young Scientist Contest
Olga A. Legonkova	Grand PhD (Technology), Head of Laboratory, A.V. Vishnevsky Institute of Surgery FSHE, RF Ministry of Health
Andrey B. Lisitsyn	Academician of RAS, Director of Gorbatov FGBNU VNIIMP
Alexander I. Martynov	PhD (Medicine), First Deputy Director of FGBU Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology

Vadim V. Medvedev	PhD (Economy), Head of Department of special programmes and development of state research centers and technopolises, Ministry of Education and Science of Russian Federation
Natalia V. Menshutina	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
Anatoly I. Miroshnikov	Academician of RAS, Chair of the Academic Council of Pushino Research Center of RAS
Sergey V. Netyosov	Corresponding Member of RAS, Pro-Rector for Research, Novosibirsk State University, Novosibirsk
Tatiana V. Ovchinnikova	Professor, Biotechnology sub-Department, Sechenov First Moscow State Medical University, Head of Research and Education Center, Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Co-Chair of Young Researchers' Contest
Victor I. Panfilov	Professor, Head of sub-Department of Biotechnology of Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Vladimir I. Petrov	Academician of RAS, Rector of Volgograd State Medical University, Volgograd
Vladimir O. Popov	Corresponding Member of RAS, Director of Bakh Institute of Biochemistry, RAS, Coordinator of Bioindustry and Bioresources BioTech-2030 Technological Platform
Vladimir V. Poroykov	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural
Vladimir A. Potapkin	Head of Chemical Engineering and Timber Processing Complex Department, Minpromtorg Russia
Lubov' .V. Rimareva	Academician of RAS, Grand PhD (Technical Science), professor, FGBNU VNIIPBT
Galina V. Sedelnikova	Professor, Deputy Director, Central Research Institute of Geological Exploration of Non-Ferrous and Noble Metals
Constantine A. Shestibratov	PhD (Biology), Forestry Biotechnology Team Lead, Pushino Branch of Institute of Bio-Organic Chemistry, Pushino
Yevgeny I. Titov	Academician of RAS, Director, Institute of Applied Biotechnology
Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, Research Head of FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg
Dmitry I. Tsyganov	Grand PhD (Technology), Professor, Ministry of Education and Science of Russian Federation
Andrey V. Vasiliev	Corresponding member of RAS, professor, Grand PhD (Biology), Director of Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences
Valentin V. Vlasov	Academician of RAS, Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

GENETIC ENGINEERING

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, В ТОМ ЧИСЛЕ ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ, В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ОТРАСЛИ

BIOTECHNOLOGY, GENE ENGINEERING AND GENOME EDITING IN AGROINDUSTRY

1. АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ PLCR-ЗАВИСИМЫХ ПРОМОТОРОВ В. CEREUS, КОНТРОЛИРУЕМЫХ СИСТЕМОЙ QUORUM SENSING, IN VIVO, Nagel A.S., Kuznitsyn R.A., Kazantseva O.A., Shadrin A.M.	11
ANALYSIS OF THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF PLCR-DEPENDENT PROMOTERS B. CEREUS, CONTROLLED BY THE QUORUM SENSING IN VIVO, Nagel A.S., Kuznitsyn R.A., Kazantseva O.A., Shadrin A.M.	11
2. ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА СТАБИЛЬНОСТЬ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ КАРБОКСИАНИДРАЗЫ, Глухов А. С., Балобанов В. А., Марченков В. В., Маркелова Н. Ю., Мельник Б. С., Катина Н. С.	12
THE INFLUENCE OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS ON THE STABILITY OF THE CARBONIC ANHYDRASE CONFORMATIONAL STATES, Glukhov A. S., Balobanov V. A., Marchenkov V. V., Markelova N. Y., Melnik B. S., Katina N. S.	13
3. ВЛИЯНИЕ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР НА АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СИЛОСА, Павленкова С.В., Толкачева А.А., Свиридова Т.В., Шуваева Г.П., Мирошниченко Л.А., Корнеева О.С.	14
STARTER CULTURES INFLUENCE ON AMINO ACID COMPOSITION OF SILAGE, Pavlenkova S.V., Tolкачева A.A., Sviridova T.V., Shuvaeva G.P., Miroshnichenko L.A., Korneeva O.S.	15
4. ДЕЙСТВИЕ МЕЛАНИНОВ ГРЕЧИХИ НА ЕСТЕСТВЕННУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И РАЗВИТИЕ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ, Мирзаева К.М., Бессарабова Е.В., Мирзаев М.Н., Почтарев А. Н.	17
THE EFFECT OF MELANINES OF BUCKWHEATS ON NATURAL RESISTANCE AND DEVELOPMENT OF CHICKEN-BROILERS, Mirzaeva K.M., Bessarabova E.V., Mirzaev M.N., Pochtarev A. N.	18
5. ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ PYRICULARIA ORYZAE CAV. В РИСОСЕЮЩИХ ЗОНАХ ЮГА РОССИИ НА ОСНОВЕ МЕТОДА ПЦР, Дубина Е.В., Харченко Е.С., Рубан М.Г., Анискина Ю.В., Шилов И.А., Макуха Ю.А.	19
STUDY OF PYRICULARIA ORYZAE CAV. BIODIVERSITY IN RICE GROWING AREAS OF SOUTH RUSSIA BY PCR-METHOD, Dubina E.V., Kharchenko E.S., Ruban M.G., Aniskina Y.V., Shlyov I.A., Makukha Y.A.	20
6. ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ TEUCRIUM CHAMAEDRIS И TEUCRIUM HYRCANICUM L., Саленко А.С.	21
THE STUDY OF THE CONDITIONS IN VITRO CULTURE OF PLANT TISSUES TEUCRIUM CHAMAEDRIS AND TEUCRIUM HYRCANICUM L., Salenko A.S.	22
7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ОЗДОРОВЛЕНИИ КАРТОФЕЛЯ ОТ ВИРУСНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, Федорова Ю.Н., Федорова Л.Н., Тельпук М.Б.	22
SALICYLIC ACID USE IN POTATO RECOVERY FROM BACTERIAL AND VIRAL INFECTION, Fyodorova Yu.N., Fyodorova L.N., Telpuk M.B.	23
8. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФРАГМЕНТАРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЯДЕРНОЙ (ITS1-ITS2) И ХЛОРОПЛАСТНОЙ (RBCL, TRNL-F) ДНК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ МЕЖДУ РОДАМИ В СЕМЕЙСТВЕ RANUNCULACEAE JUSS, Евдокимов И.Ю.	24
USING FRAGMENTAL SEQUENCES OF NUCLEAR (ITS1-ITS2) AND CHLOROPLASTIC (RBCL, TRNL-F) DNA FOR THE STUDY OF PHYLOGENETIC RELATIONS BETWEEN RODES IN THE FAMILY OF RANUNCULACEAE JUSS, Evdokimov I.Yu.	25

9. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (НА ПРИМЕРЕ IRIS L. И POTENTILLA L.), Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н., Мартиросян Ю.Ц.	26
THE SCIENTIFIC RATIONALE FOR THE DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGY PRODUCTION OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL (FOR EXAMPLE, IRIS L. AND POTENTILLA L.), Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Ilicheva T.N., Martirosian Yu.Cs.	27
10. ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБОВ РАЗМНОЖЕНИЯ И ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ IN VITRO, Творогова В.Е., Кудряшов А.А., Лутова Л.А.	28
SORTIMIZATION OF METHODS OF PLANT REPRODUCTION AND TRANSFORMATION IN VITRO, Tvorogova V.E., Kudryashov A.A., Lutova L.A.	29
11. ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ МЫШИНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С ГЕНАМИ РЕЦЕПТОРА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ (ELR1) И ЦИКЛИНА T1 (eCT1) ЛОШАДИ, Савченкова И.П., Савченкова Е.А.	29
OBTAINING A STABLE MOUSE GENETIC TRANSFORMED CELL LINE WITH GENES OF THE RECEPTOR FOR EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS (ELR1) AND CYCLIN T1 (eCT1), Savchenkova I.P., Savchenkova E.A.	30
12. ПОТЕНЦИАЛ ESCHERICHIA COLI ДЛЯ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОГО БИОСИНТЕЗА (S)-(+)-1,3-БУТАНДИОЛА ПО ОБРАЩЕНОМУ ПУТИ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.	31
POTENCIAL OF ESCHERICHIA COLI FOR STEREOSELECTIVE BIOSYNTHESIS OF (S)-(+)-1,3-BUTANEDIOL THROUGH THE INVERTED FATTY ACID BETA-OXIDATION PATHWAY, Gulevich A.Yu., Skorokhodova A.Yu., Debabov V.G.	32
13. ПРИМЕНЕНИЕ SSCP АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ PHYTOPHTHORA INFESTANS, Чижик В.К., Мартынов В.В., Соколова Е.А., Кузнецова М.А., Хавкин Э.Е.	33
EUSING SSCP ANALYSIS TO CHARACTERIZATION OF POLYMORPHISM OF VIRULENCE GENES IN PHYTOPHTHORA INFESTANS, Chizhik V.K., Martynov V.V., Sokolova E.A., Kuznetsova M.A., Khavkin E.E.	33
14. ПРЕДПОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА СЕМЯН ЯЧМЕНЯ, Кулабухов В.Ю., Гарибян Ц.С.	34
PRESOVING TREATMENT OF BARLEY SEEDS, KULABUHOV V.YU., GARIBYAN TS.C.	35
15. РОСТ ARTHROSPIRA PLATENSIS ПОСЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ, Петрухина Д.И.	35
ARTHROSPIRA PLATENSIS GROWTH AFTER PROLONGED STORAGE, Petrukhina D.I.	37
16. СБОРКА ПОЛНОГЕНОМНОЙ КОПИИ ДНК ВЫСОКОАКТИВНОГО ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА ВИРУСА СЕНДАЙ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ, Зайнутдинов С.С., Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф.	38
ASSEMBLING A COMPLETE GENOMIC DNA COPY OF A HIGHLY ACTIVE ONCOLYTIC VARIANT OF SENDAI VIRUS TO DESIGN A VECTOR SYSTEM FOR GENE THERAPY, Zainutdinov S.S., Tkacheva A.V., Sivolobova G.F.	39
17. ТРАНСКРИПТОМИКА, МЕТАБОЛОМИКА И ПРОТЕОМИКА СИМБИОЗОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (PISUM SATIVUM L.): НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ В МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНОЙ СИСТЕМЕ, Жуков В.А., Афонин А.М., Мамонтова Т., Ihling C., Соболева А., Ахтемова Г.А., Штарк О.Ю., Жернаков А.И., Кулаева О.А., Ключкова М.С., Грибченко Э.С., Лукашева Е., Сулима А.С., Пузанский Р.К., Шишова М.Ф., Sinz A., Фролов А., Тихонович И.А.	40
TRANSCRIPTOMICS, METABOLOMICS AND PROTEOMICS OF SYMBIOSES OF GARDEN PEA (PISUM SATIVUM L.): A NEW LOOK AT PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT IN A MULTICOMPONENT PLANT-MICROBIAL SYMBIOTIC SYSTEM, Zhukov V.A., Afonin A.M., Mamontova T., Ihling C., Soboleva A., Akhtemova G.A., Shtark O.Y., Zhernakov A.I., Kulaeva O.A., Kliukova M.S., Gribchenko E.S., Lukasheva E., Sulima A.S., Puzanskiy R.K., Shishova M.F., Sinz A., Frolov A., Tikhonovich I.A.	41
18. ЭКСПРЕССИЯ И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ЭМБРИО- И ЭНДОСПЕРМОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ, Чумаков М.И., Волохина И.В., Гусев Ю.С., Гуторова О.В., Моисеева Е.М.	42
EXPRESSION AND CRISPR/CAS9-EDITING OF MAIZE EMBRYO- AND ENDOSPERM DEVELOPMENT GENES, Chumakov M.I., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Gutorova O.V., Moiseeva E.M.	43

УДК 577.218

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ PLcR-ЗАВИСИМЫХ ПРОМОТОРОВ *B. CEREUS*, КОНТРОЛИРУЕМЫХ СИСТЕМОЙ QUORUM SENSING, IN VIVO

Нагель А.С., Кузницын Р.А., Казанцева О.А., Шадрин А.М.

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований» РАН. Пущино, Россия
142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 3.
e-mail: anagell@mail.ru

В данной работе мы представляем анализ транскрипционной активности PlcR-зависимых промоторов *in vivo*, в зависимости от стадий роста культуры *Bacillus subtilis* BD170 с интегрированной последовательностью генов, кодирующих экспрессию PlcR и PapR, участвующих в регуляции экспрессии факторов патогенности с помощью quorum sensing.

Ключевые слова: quorum sensing, регуляция транскрипции, репортерный ген, PlcR-PapR, факторы патогенности.

Многие внеклеточные факторы патогенности микроорганизмов группы *Bacillus cereus* контролируются генами *plcR* и *papR*, которые кодируют, соответственно, транскрипционный регулятор PlcR и пептид PapR. PlcR, как правило, участвует в регуляции транскрипции генов, кодирующих факторы патогенности у микроорганизмов группы *Bacillus cereus*. PapR – это синтезируемый матрично пептид, представляющий собой 44 аминокислотных остатка, который в зрелой форме представляет собой гепта- или пентапептид, способный к специфическому взаимодействию с молекулой PlcR, вызывая тем самым изменения в его конформации, необходимые для специфического взаимодействия с ДНК.

Микроорганизмы группы *Bacillus cereus*, к которой относят несколько видов близкородственных бактерий, широко распространены в природе и часто встречаются в почве. Недавно *B. cereus* были обнаружены на международной космической станции.

PlcR способен активировать транскрипцию более половины генов токсинов *Bacillus cereus*, которые служат основными причинами развития множества заболеваний и пищевых отравлений.

Для анализа транскрипционной активности PlcR зависимых промоторов *in vivo* были созданы рекомбинантные штаммы *Bacillus subtilis* (не являются патогенными), содержащие интегрированную в хромосому систему quorum sensing *plcR-papR* и плазмиды с репортерным геном *egfp* под контролем регулируемых quorum sensing промоторов и был проведен сравнительный анализ экспрессии eGFP.

В данной работе мы представляем сравнительный анализ эффективности промоторов, контролируемых PlcR-PapR в *Bacillus*, в зависимости от стадий роста культуры.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-01017

UDC 577.218

ANALYSIS OF THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF PLcR-DEPENDENT PROMOTERS *B. CEREUS*, CONTROLLED BY THE QUORUM SENSING IN VIVO

Nagel A.S., Kuznitsyn R.A., Kazantseva O.A., Shadrin A.M.

In this paper, we present an analysis of transcriptional activity of PlcR-dependent *in vivo* promoters, depending on the growth stages of a *Bacillus subtilis* BD170 culture with an integrated sequence of genes encoding the expression of PlcR and PapR involved in the regulation of the expression of pathogenicity factors using quorum sensing.

Key words: quorum sensing, transcription regulation, reporter gene, PlcR-PapR, pathogenicity factors.

Many extracellular factors of pathogenicity of microorganisms of the *Bacillus cereus* group are controlled by the *plcR* and *papR* genes, which encode, respectively, the transcriptional regulator PlcR and the peptide PapR. PlcR is usually involved in the regulation of transcription of genes encoding pathogenicity factors in microorganisms of the *Bacillus cereus* group. PapR is a matrix-synthesized peptide that is 44 amino acid residues, which in its mature

form is a hepta- or pentapeptide capable of specific interaction with the PlcR molecule, thereby causing changes in its conformation necessary for a specific interaction with DNA.

Microorganisms of the *Bacillus cereus* group, to which several species of closely related bacilli belong, are widespread in nature and are often found in the soil. Recently *B. cereus* has been detected on the international space station.

PlcR is able to activate the transcription of more than half of the genes of *Bacillus cereus* toxins, which are the main causes of the development of many diseases and food poisoning.

To analyze the transcriptional activity of PlcR dependent promoters in vivo, recombinant *Bacillus subtilis* strains (not pathogenic) were created that contain the quorum sensing *plcR-papR* integrated into the chromosome and plasmids with the egfp reporter gene under the control of regulated quorum sensing promoters and a comparative analysis was performed.

In this work, we present a comparative analysis of the effectiveness of promoters controlled by PlcR-PapR in *Bacillus*, depending on the growth stages of the culture.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-01017

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА СТАБИЛЬНОСТЬ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ

Глухов А.С.¹, Балобанов В.А.¹, Марченков В.В.¹, Маркелова Н.Ю.², Мельник Б.С.¹, Катина Н.С.¹

¹ФГБУН Институт белка РАН, Пушкино, Россия
142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, д. 4
²Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия
142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, д. 3
e-mail: gluktol@gmail.com

Исследовано равновесное разворачивание мочевиной карбоксиангидразы дикого типа и ее мутантных форм L139A, I208A и M239A при трех значениях pH. На основании полученных данных определены стадии сворачивания, на которых каждый из трех остатков формирует взаимодействия в структуре белка.

Ключевые слова: карбоксиангидраза Б; промежуточные состояния; сворачивание белка; триптофановая флуоресценция

Неправильное сворачивание белков может приводить к развитию амилоидных заболеваний человека, а также к формированию тел включения при экспрессии белков в бактериальных клетках. В связи с этим процесс самоорганизации белков является важным предметом исследований молекулярной биофизики, биотехнологии и медицины. К настоящему времени сворачивание простых белков исследовано достаточно подробно, тогда как сворачивание белков, протекающее с формированием нескольких промежуточных состояний, остается недостаточно изученным.

Для того чтобы выяснить последовательность самоорганизации многостадийного белка, важно определить, какие его участки структурированы в каждом промежуточном состоянии. Одним из подходов, используемых для таких исследований, является точечный мутагенез: крупные гидрофобные аминокислотные остатки заменяют на аланин и исследуют влияние данных замен на стабильность конформационных состояний белка. Если исследуемый аминокислотный остаток формирует взаимодействия в структуре конкретного состояния, то уменьшение гидрофобности боковой группы вследствие замены приведет к дестабилизации этого состояния по сравнению с белком дикого типа. В данной работе такой подход был использован для исследования сворачивания карбоксиангидразы Б. Сворачивание карбоксиангидразы протекает с формированием как минимум двух промежуточных состояний [1]. Нами были выбраны три гидрофобных аминокислотных остатка, расположенные в различных структурных элементах карбоксиангидразы, и получены мутантные формы, содержащие замены данных остатков на аланин: L139A, I208A и M239A.

При разворачивании карбоксиангидразы понижением pH наблюдается практически полное накопление конформационных состояний при определенных значениях pH: нативного N при pH 5,6, первого промежуточного I₁ при pH 4,4 и второго промежуточного состояния I₂ при pH 2,4. В данной работе при трех соответствующих значениях pH было проведено равновесное разворачивание мочевиной белка дикого типа и его мутантных форм. Переходы разворачивания регистрировали методом триптофановой флуоресценции. Математическая обработка полученных данных позволила оценить стабильность конформацион-

ных состояний исследованных белков. Показано, что замена I208A приводит к дестабилизации второго промежуточного состояния I_2 относительно развернутого состояния U по сравнению с белком дикого типа, следовательно, данный остаток формирует взаимодействия на первой стадии сворачивания карбоксиангидразы $U \rightarrow I_2$. Замены L139A и M239A не изменили стабильность состояния I_2 по сравнению с белком дикого типа, при этом замена L139A приводит к дестабилизации I_1 , то есть данный остаток формирует взаимодействия на второй стадии сворачивания $I_2 \rightarrow I_1$. Замена M239A оказывает влияние только на стабильность нативного состояния N, это свидетельствует о том, что данный участок структурируется на последней видимой стадии сворачивания $I_1 \rightarrow N$.

Таким образом, в работе по результатам равновесных экспериментов получена новая информация о последовательности сворачивания карбоксиангидразы Б. Представленный подход может быть использован в дальнейшем для исследования самоорганизации данного белка и структуры его промежуточных состояний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00935.

Литература:

1. Uversky V. N., Ptitsyn O. B. Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 255, № 1. – P. 215-228.

THE INFLUENCE OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS ON THE STABILITY OF THE CARBONIC ANHYDRASE CONFORMATIONAL STATES

Glukhov A.S.¹, Balobanov V.A.¹, Marchenkov V.V.¹, Markelova N.Y.², Melnik B.S.¹, Katina N.S.¹

¹*Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia
142290, Moscow region, Pushchino, Institutskaya st., 4*

²*Institute of cell's biophysics RAS, Pushchino, Russia
142290, Moscow region, Pushchino, Institutskaya st., 3
e-mail: gluktol@gmail.com*

Equilibrium urea-induced unfolding of carbonic anhydrase wild type and its mutant forms L139A, I208A and M239A have been studied at three pH values. On the basis of the data obtained the stages of folding where each of the three residues forms interactions in protein structure have been determined.

Key words: carbonic anhydrase; intermediate states; protein folding; tryptophan fluorescence

Incorrect proteins folding can lead to human amyloid diseases development, as well as to formation of inclusion bodies during expression in bacterial cells. In that regard self-organization process of proteins represents important question under study by molecular biophysics, biotechnology and medicine. To date folding of simple proteins has been studied in details, while protein folding ongoing through formation of several intermediate states remains insufficiently explored.

To reveal sequencing of multistate protein self-organization, it is important to determine proteins regions structured in each intermediate state. One approach used for these investigations is point mutagenesis: large hydrophobic amino acid residues are replaced by alanine and the influence of these substitutions on the stability of protein conformational states is studied. If mutated residue forms interactions in the structure of specific state, therefore decreasing hydrophobicity of the side chain as a result of mutation will lead to destabilization of this state in comparison with wild type protein. In this work this approach was used for investigation of carbonic anhydrase B folding. Carbonic anhydrase folding proceeds through formation of at least two intermediate states [1]. Three large hydrophobic amino acid residues, situated in different structural elements of carbonic anhydrase, have been chosen, and mutant forms with substitutions of these residues by alanine, have been obtained: L139A, I208A and M239A.

During carbonic anhydrase pH-induced unfolding the accumulation of conformational states at a certain pH values is observed: the native state N at pH 5,6, the first intermediate state I_1 at pH 4,4 and the second intermediate state I_2 at pH 2,4. In this work at three corresponding pH values equilibrium urea-induced unfolding of wild type protein and its mutant forms have been carried out, unfolding transitions were monitored by tryptophan fluorescence. Mathematical treatment of obtained data allowed estimation of the stability of the studied proteins conformational

states. It was shown that substitution I208A leads to the destabilization of the second intermediate state I_2 relative to the unfolded state U in comparison with wild type protein, therefore this residue forms interactions during the first stage of carbonic anhydrase folding $U \rightarrow I_2$. Substitutions L139A and M239A did not change the stability of the state I_2 in comparison with wild type protein, however substitution L139A leads to the destabilization of I_1 , therefore this residue forms interactions at the second stage of folding $I_2 \rightarrow I_1$. Substitution M239A influences only on the stability of the native state N, this indicates that this region is structured at the last visible stage of folding $I_1 \rightarrow N$.

Thus, in this work based on the results of equilibrium unfolding experiments new information about consistency of carbonic anhydrase folding was obtained. Represented approach can be used further for investigation of this protein self-organization and the structure of its intermediate states.

Investigation was supported by financial assistance of RFBR in the context of the scientific project № 18-34-00935.

References:

1. Uversky V. N., Ptitsyn O. B. Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature // J. Mol. Biol. – 1996. – Vol. 255, № 1. – P. 215-228.

УДК 606:631:577

ВЛИЯНИЕ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР НА АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СИЛОСА

Павленкова С.В.¹, Толкачева А.А.¹, Свиридова Т.В.¹, Шуваева Г.П.¹, Мирошниченко Л.А.², Корнеева О.С.¹

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
394036, Россия, Воронеж, проспект Революции, д. 19

²ООО «Русская олива», Воронеж, Россия
e-mail: sveta5501pavlenkova@yandex.ru

Установлено, что количество аминокислот в различных вариантах силоса зависит от применяемых для силосования заквасочных культур.

Ключевые слова: зеленая масса амаранта; аминокислотный состав; амарантовый силос; заквасочные культуры

Создание прочной кормовой базы является одним из приоритетных направлений в развитии животноводческой отрасли России [1]. Известно, что продуктивность коров молочной породы в значительной степени зависит от наличия незаменимых аминокислот, в особенности лизина и метионина, которые непрерывно должны поступать в рацион животных с кормами [2]. Одной из наиболее востребованных кормовых культур в последнее время является амарант, аминокислотный состав белка которого близок к идеальному белку и в отличие от большинства традиционных кормовых культур содержит лизин и метионин.

Цель работы заключалась в определении влияния заквасочной культуры на аминокислотный состав высокобелкового силоса из зеленой массы амаранта, в особенности на содержание лизина и метионина. Для силосования зеленой массы амаранта в стадии молочно-восковой спелости, использовали 3 варианта заквасочных культур, включающих молочнокислые бактерии родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*.

Массовую долю аминокислот в образцах определяли методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence. Максимальное содержание метионина и лизина, наблюдалось в силосе, заложенном с использованием 2 варианта силосной закваски (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*). Массовая доля метионина и лизина в сухом веществе силоса составила 0,11 и 0,72 % соответственно, что на 0,04 и 0,27 % выше, чем в образце №1 (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*) и на 0,04 и 0,28 % выше, чем в образце №3 (*Lactococcus*, *Leuconostoc*) (таблица 1). Следует отметить, что аналогичные данные получены по содержанию всех определяемых аминокислот, за исключением аланина и цистеина. Массовая доля аланина и цистеина в образце № 2 составила 0,84 и 0,04 %, что на 0,12 и 0,05 % ниже, чем в образце № 1 и на 0,25 и 0,01 % выше, чем в образце №3.

Таким образом, установлено, что количество аминокислот в различных вариантах силоса зависит от

применяемых для силосования заквасочных культур. Наиболее предпочтительным для получения высокобелкового силоса является применение заквасочной культуры, содержащей молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*.

Исследования выполнены при поддержке государственного задания Минобрнауки РФ №40.4149.2017/ПЧ.

Литература:

1. Попова С.А. *Modern approaches to protein nutrition of highly productive cows* // Псковский региональный журнал. – 2009. - №7. – С. 26-30.
2. Лушников Н.А. Кормовая добавка Оптиген в рационах лактирующих коров [Текст] / Н.А. Лушников, М.Е. Столбова, Е.В. Рудецкая // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. – 2011. - № 10. – С. 12-15.

Таблица 1. Аминокислотный состав различных вариантов силоса

№	Аминокислоты	Вариант силоса		
		№1	№2	№3
		Массовая доля в СВ, %		
1	аспаргиновая кислота + аспаргин	0,73	1,18	0,75
2	треонин	0,36	0,54	0,37
3	серин	0,34	0,48	0,41
4	глутаминовая кислота + глутамин	0,90	1,31	0,89
5	глицин	0,59	0,68	0,50
6	аланин	0,96	0,84	0,59
7	цистеин	0,09	0,04	0,03
8	валин	0,58	0,73	0,50
9	метионин	0,07	0,11	0,07
10	изолейцин	0,49	0,61	0,42
11	лейцин	0,79	0,97	0,68
12	тирозин	0,24	0,36	0,22
13	фенилаланин	0,48	0,63	0,43
14	лизин	0,45	0,72	0,44
15	аргинин	3,62	4,52	2,20
16	пролин	0,43	0,60	0,42

UDC 606:631:577

STARTER CULTURES INFLUENCE ON AMINO ACID COMPOSITION OF SILAGE

Pavlenkova S.V.¹, Tolkacheva A.A.¹, Sviridova T.V.¹, Shuvaeva G.P.¹, Miroshnichenko L.A.², Korneeva O.S.¹

¹Voronezh state university of engineering technologies, Voronezh, Russia
394036, Russia, Voronezh, Revolutsii av., 19

²ООО «Russkaya Oliva», Voronezh, Russia
e-mail: sveta5501pavlenkova@yandex.ru

It was demonstrated that the amount of amino acids depends on used starter cultures.

Key words: green mass of amaranth; amino acid composition of silage; amaranth silage; starter cultures

One of the priorities in the development of the livestock industry in Russia is a developing of a solid feed base [1]. It is known that the productivity of dairy cows largely depends on the content of essential amino acids, especially lysine and methionine, which must be permanently included to the cattle's diet [2]. In recent time amaranth is going to be one of the most popular forage crops, because its protein's amino acid composition is close to the ideal and

unlike most of traditional forage crops it contains lysine and methionine.

The aim of the work was to determine the influence of starter culture on the amino acid composition of high-protein silage made of amaranth green mass, specifically its effect on lysine and methionine content. Three different combination of starter cultures containing lactic acid bacteria of genera *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc* were used to silage the green mass of amaranth in the phase of milk-wax ripeness.

For detection of mass fraction of amino acids in samples by ion-exchange chromatography with post column derivatisation with ninhydrin method liquid chromatograph Shimadzu LC-20 Prominence was used. The maximum content of methionine and lysine was recognized in the test piece N2 (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*). The mass fraction of methionine and lysine in the dry matter of silage was 0.11% and 0.72% respectively, which is 0.04% and 0.27% higher than in the test piece N1 (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*) and 0.04% and 0.28% higher than in the test piece N3 (*Lactococcus*, *Leuconostoc*), for more detail see Table1. It should be noted obtained data on all amino acids except alanine and cysteine were corresponding. The mass fraction of alanine and cysteine in the test piece N2 was 0.84% and 0.04 % respectively, which is 0.12% and 0.05% lower than in the test piece N1 and 0.25% and 0.01% higher than in the test piece N3.

Table 1. Amino acid composition of different silage complex

№	Amino acid	Test piece		
		№1	№2	№3
		Mass fraction in dry matter, %		
1	aspartic acid + asparagine	0,73	1,18	0,75
2	threonine	0,36	0,54	0,37
3	serine	0,34	0,48	0,41
4	glutamic acid + glutamine	0,90	1,31	0,89
5	glycine	0,59	0,68	0,50
6	alanine	0,96	0,84	0,59
7	cysteine	0,09	0,04	0,03
8	valine	0,58	0,73	0,50
9	methionine	0,07	0,11	0,07
10	isoleucine	0,49	0,61	0,42
11	leucine	0,79	0,97	0,68
12	tyrosine	0,24	0,36	0,22
13	phenylalanine	0,48	0,63	0,43
14	lysine	0,45	0,72	0,44
15	arginine	3,62	4,52	2,20
16	proline	0,43	0,60	0,42

It was demonstrated that the amount of amino acids depends on used starter cultures. The optimum condition for high-protein silage recovery is using starter cultures contain lactic acid bacteria of genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc*.

The research was carried out with the support of the state task Ministry of science and highest education of the Russian Federation №40.4149.2017/ПЧ.

References:

1. Popova S.A Modern approaches to protein nutrition of highly productive cows// *Pskov regional journal*. – 2009. – №7. - P. 26-30.
2. Lushnikov N.A., Stolbova M.E., Rydeckaya E.V. Feed additive Optigen in the diets of lactating cows // *Feeding of farm animals and feed production* –2011. – №10. - P. 12-15.

УДК 606: 614.9: 664.6/.7

ДЕЙСТВИЕ МЕЛАНИНОВ ГРЕЧИХИ НА ЕСТЕСТВЕННУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И РАЗВИТИЕ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Мирзаева К.М.¹, Бессарабова Е.В.², Мирзаев М.Н.², Почтарев А. Н.²

¹Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственное объединение «ЭКОБИОВЕТ», Москва, Россия

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23, стр.8

email: niacid@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия
109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

Работа посвящена изучению влияния меланинов (Мелавитин) лузги гречихи на такой важнейший показатель неспецифической резистентности цыплят-бройлеров, как тиол-дисульфидное соотношение (SH/SS). Показано также развитие и сохранность бройлеров получавших меланины с питьевой водой.

Ключевые слова: меланины гречихи, антиоксидантная активность, тиол-дисульфидное соотношение, неспецифическая резистентность

Полифункциональная роль меланинов в обеспечении защиты организмов при действии различных негативных факторов среды широко доказана на сегодняшний день [2, 3; ТУ №9169-001-35231285-13 Экстракт лузги гречихи «Мелавит» от 27.06.2013 г.]. Это указывает на возможность применения их в качестве действующих субстанций фармацевтических препаратов, биологически активных и кормовых добавок для медицины и ветеринарии.

Предлагаемая работа касается выявления возможного действия меланинов гречихи (Мелавитин) на развитие и естественную резистентность цыплят-бройлеров. Исследования проведены в условиях ОАО «Кучинская птицефабрика», препарат давали с первых по четвертые сутки с питьевой водой. Было сформировано по принципу аналогов три группы цыплят по 1440 голов в каждой (8, 9, 10 секции). Цыплята 8-ой секции (группа №1) контрольная, получали чистую питьевую воду согласно породным нормативам. Цыплята 9-ой секции получали мелавитин в дозе 1000 мкг/кг, цыплята 10-ой секции - получали препарат в дозе 3000 мкг/кг.

Для оценки неспецифической резистентности организма птиц использованы показатели тиол-дисульфидной системы (ТДС), т.е. отношение сульфгидрильных групп к дисульфидным в крови. Как известно при различных патологиях и нарушениях обменных процессов отмечается снижение содержания SH-групп и увеличение количества SS-групп [1]. Определяли также содержание в крови малонового диальдегида (МДА), выступающего в качестве критерия антиоксидантных процессов [4].

Полученные данные (Таблица 1) показывают, что концентрация МДА в крови цыплят-бройлеров ниже в группах, получавших препарат. Наблюдается также рост концентрации сульфгидрильных групп и снижение дисульфидных групп в опытных группах. В итоге, тиол-дисульфидное соотношение в крови подопытных цыплят выше по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1. Показатели неспецифической резистентности и сохранность цыплят-бройлеров

Исследуемые показатели	Группа птиц		
	Контрольная, №1	Опытная, №2	Опытная, №3
SH	0,593±0,05	0,647±0,11	0,785±0,13
SS	0,313±0,07	0,277±0,06	0,242±0,06
SH/SS	1,85	2,34	2,73
МДА	3,19±0,69	3,02±0,52	2,36±0,44
Сохранность поголовья, %	94,9	96,1	97,7

Таким образом, меланины гречихи оказывают положительное воздействие на неспецифическую резистентность и интенсивность обменных процессов организма птиц, связанных с жизнеспособностью, ростом и развитием на протяжении всего технологического цикла выращивания.

Литература:

1. Майстров В.И., Галочкина В.П. Антиоксидантно-антирадикальная и тиол-дисульфидная системы племенных бычков под влиянием комплекса биологически активных веществ // С.-х. биология. - 2006. - № 2. - С. 64-68.
2. Мирзаева К.М., Мельницкая Т.И., Мирзаев М.Н., Бессарабова Е.В., Молокова Е.И. Протекторные свойства растительных меланинов (Мелавит) // Материалы VIII международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М., 2015. - Ч.2. - С. 151-152.
3. Мирзаев М.Н., Мельницкая Т.И., Мирзаева К.М., Девришов Д.А., Сопов Л.П., Почтарев А.Н. Действие меланинов на некоторые процессы метаболизма крыс, подвергшихся воздействию токсичных доз авермектинов // Ветеринарная медицина. - 2013. - №1-2. - С. 60-63.
4. Asahawa T., Natushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, 1980, 15(3): 137-140.

UDC 606: 614.9: 664.6/.7

THE EFFECT OF MELANINES OF BUCKWHEATS ON NATURAL RESISTANCE AND DEVELOPMENT OF CHICKEN-BROILERS

Mirzaeva K.M.¹, Bessarabova E.V.², Mirzaev M.N.², Pochtarev A. N.²

¹Limited Liability Company Scientific Production Association «ECOBIOVET», Moscow, Russia
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23 bldg. 8
email: niacid@yandex.ru

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin",
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23

The work is devoted to the study of the effect of melanin (melavitin) buckwheat husks on such an important indicator of nonspecific resistance of broiler chickens as the thiol-disulfide ratio (SH / SS). The development and preservation of broilers treated with melanin with drinking water is also shown.

Key words: buckwheat melanins, antioxidant activity, thiol-disulfide ratio, non-specific resistance

The polyfunctional role of melanins in ensuring the protection of organisms under the action of various negative environmental factors has been widely proven to date [2, 3; TU № 9169-001-35231285-13 Extract of buckwheat husk "Melavit" dated 06.26.2013]. This indicates the possibility of their use as active substances of pharmaceutical preparations, biologically active and feed additives for medicine and veterinary medicine.

The proposed work concerns the identification of the possible effects of buckwheat melanins (Melavitin) on the development and natural resistance of broiler chickens. The studies were carried out in the conditions of OJSC "Kuchinskaya Poultry Farm", the drug was given from the first to the fourth day with drinking water. Three groups of chickens with 1440 animals each (8, 9, 10 sections) were formed on the principle of analogs. Chickens of the 8th section (group No. 1) control, received clean drinking water according to breed standards. Chickens of the 9th section received melavitin at a dose of 1000 µg / kg, chickens of the 10th section received a preparation at a dose of 3000 µg / kg.

To assess the non-specific resistance of the organism of birds, indicators of the thiol-disulfide system (TDS) were used, i.e. the ratio of sulfhydryl groups to disulfide in the blood. As is well known in various pathologies and disorders of metabolic processes, a decrease in the content of SH-groups and an increase in the number of SS-groups are observed [1]. The content in the blood of malonic dialdehyde (MDA), which serves as a criterion for antioxidant processes, was also determined [4].

The data obtained (Table 1) show that the concentration of MDA in the blood of broiler chickens is lower in the groups receiving the drug. There is also an increase in the concentration of sulfhydryl groups and a decrease in disulfite groups in the experimental groups. As a result, the thiol-disulfide ratio in the blood of experimental chickens is higher compared with the control group.

Table 1. Indicators of nonspecific resistance and safety of broiler chickens

The studied indicators	Group of birds		
	Control, №1	Experienced, №2	Experienced, №3
SH	0,593±0,05	0,647±0,11	0,785±0,13
SS	0,313±0,07	0,277±0,06	0,242±0,06
SH/SS	1,85	2,34	2,73
MDA	3,19±0,69	3,02±0,52	2,36±0,44
The safety of livestock, %	94,9	96,1	97,7

Thus, buckwheat melanins have a positive effect on non-specific resistance and intensity of metabolic processes in the body of birds, associated with viability, growth and development throughout the entire technological cycle of cultivation.

References:

1. Maistrov V.I., Galochkina V.P. Antioxidant-antiradical and thiol-disulfide systems of pedigree gobies under the influence of a complex of biologically active substances // S.-kh. biology. - 2006. - № 2. - p. 64-68.
2. Mirzaeva K.M., Melnitskaya T.I., Mirzaev M.N., Bessarabova E.V., Molokova E.I. Protector properties of plant melanins (Melavit) // Proceedings of the VIII International Congress "Biotechnology: state and development prospects." M., 2015. - P.2. - C.151-152.
3. Mirzaev M.N., Melnitskaya T.I., Mirzaeva K.M., Devrishov D.A., Sopov L.P., Pochtarev A.N. The effect of melanins on some metabolic processes of rats exposed to toxic doses of avermectins // Veterinary medicine. - 2013. - №1-2. - p. 60-63.
4. Asahawa T., Natsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. Lipids, 1980, 15(3): 137-140.

УДК 575.488.42

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ PYRICULARIA ORYZAE CAV. В РИСОСЕЮЩИХ ЗОНАХ ЮГА РОССИИ НА ОСНОВЕ МЕТОДА ПЦР

Е.В. Дубина, Е.С. Харченко, М.Г. Рубан, Ю.В. Анискина, И.А. Шилов, Ю.А. Макуха

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса», п. Белозерный, Краснодар, Россия
350921, Краснодар, пос. Белозёрный, 3
e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Проведен мониторинг и выделено 57 штаммов патогена *Pyricularia oryzae* Cav. из поражённого гербарного материала, собранного с полей из восьми экологических рисосеющих зон Краснодарского края. С использованием мультиплексной ПЦР среди изученных штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. выявлено 22 генотипа, каждый из которых характеризуется уникальным генетическим профилем.

Ключевые слова: рис, пирикулярриоз, изоляты, ПЦР, микросателлитные маркеры, ДНК-паспорта, гены (а) вирулентности

Цель работы - изучить молекулярно-генетическую структуру высоковариабельного грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae* Cav., а также определить эффективные гены вирулентности для разработки стратегии иммуногенетической защиты риса от пирикулярриоза в условиях эпифитотийного развития болезни на юге России, сочетающей в себе как экологичность, ресурсо- и энергосбережение, так и высокую эффективность для обеспечения продовольственной безопасности страны.

Такие знания представляют особый интерес, поскольку позволяют прогнозировать появление новых рас и патотипов *Pyricularia oryzae* Cav., а также определять гены (а) вирулентности в рисосеющих регионах России. Последнее является необходимой теоретической базой для создания генетических источников с длительной устойчивостью к пирикулярриозу. На основе молекулярно-генетических подходов проведено изучение генетической структуры и биоразнообразия фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. на юге России (1, 2). Проведен мониторинг и выделено 57 штаммов патогена из поражённого гербарного материала, собранного с полей из восьми экологических рисосеющих зон Краснодарского края (Красноармей-

ского, Калининского, Крымского, Абинского, Темрюкского, Северского, Славянского районов, Краснодар), а также Ростовской области (Пролетарский район) и Республики Адыгея.

Разработана мультиплексная ПЦР на основе фрагментного анализа для идентификации выделенных изолятов. С её использованием среди изученных штаммов *Pyricularia oryzae* Cav. выявлено 22 генотипа, каждый из которых характеризуется уникальным генетическим профилем. Составлены их ДНК-паспорта. Изученные изоляты возбудителя пирикулярриоза охарактеризованы по морфолого-культуральным признакам. На основе фитопатологического теста с использованием сортов-дифференциаторов риса выявлен количественный и качественный состав генов (а)вирулентности в грибных штаммах. Определены эффективные гены устойчивости к патогену на юге России, которые рекомендованы для селекционных программ по созданию резистентных сортов риса к пирикулярриозу.

Исследования выполнены при поддержке гранта ФГБУ «РФФИ» «р_а» № 16-44-230178 «Изучение генетической структуры популяции возбудителя *Pyricularia oryzae* Cav. и научное обоснование иммуногенетической защиты культуры риса» в лабораториях защиты риса и биотехнологии и молекулярной биологии Всероссийского научно-исследовательского института риса, а также при совместном сотрудничестве с Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной биотехнологии (г. Москва) и Аграрным научным центром «Донской» (г. Зерноград).

Литература:

1. Li C. Y., Li J. B., Liu L., et al. Development of minisatellite markers in phytopathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 131: 144-152.
2. Ahn S.N., Kim Y.K., Han S.S., et al. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast. *Rice Genet. Newsl.*, 1996, 13: 74-76.

UDK 575.488.42

STUDY OF PYRICULARIA ORYZAE CAV. BIODIVERSITY IN RICE GROWING AREAS OF SOUTH RUSSIA BY PCR-METHOD

E.V. Dubina, E.S. Kharchenko, M.G. Ruban, Y.V. Aniskina, I.A. Shylov, Y.A. Makukha

FSBSI «All-Russian Rice Research Institute», p. Belozerniy, Krasnodar, Russia 125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1
e-mail: lenakrug1@rambler.ru

57 strains of pathogen were monitored and selected from the damaged herbarium material collected from the fields of six ecological rice-growing zones of the Krasnodar Region. With the use of multiplex PCR 22 genotypes were identified among the studied strains of *Pyricularia oryzae* Cav., each of them is characterized by a unique genetic profile.

Key words: rice, blast, isolates, PCR, microsatellite markers, DNA-passports, avirulence genes

The aim of the study was to study the molecular genetic structure of the highly variegated fungal phytopathogen *Pyricularia oryzae* Cav., and to determine the effective virulence genes for the development of a strategy for immunogenetic protection of rice from blast in conditions of epiphytotic development of the disease in southern Russia, combining both environmental friendliness, resource and energy conservation and high efficiency for ensuring the country's food security.

Such knowledge is of particular interest, since it allows to predict the appearance of new races and pathogens of *Pyricularia oryzae* Cav., and also to determine genes of (a)virulence in rice-growing regions of Russia. The latter is an indispensable theoretical basis for the development of genetic sources with long-lasting resistance to blast.

Based on molecular genetic approaches, a study of the genetic structure and biodiversity of the phytopathogenic fungus *Pyricularia oryzae* Cav. in the south of Russia was conducted. 57 strains of pathogen were monitored and selected from the damaged herbarium material collected from the fields of eight ecological rice-growing zones of the Krasnodar Region (Krasnoarmeysky, Kalininsky, Krymskiy, Abinsky, Temryuksky, Seversky, Slavyansky districts), Krasnodar, the Rostov Region (Proletarsky District) and Adygeya republic.

A multiplex PCR was developed on the basis of fragment analysis to identify selected isolates. With its use 22 genotypes were identified among the studied strains of *Pyricularia oryzae* Cav., each of them is characterized by a unique genetic profile. Their DNA-passports have been compiled. The studied isolates of the blast agents were characterized by morphological and cultural traits. On the basis of a phytopathological test using differentiator

rice varieties, the quantitative and qualitative composition of genes of (a)virulence in fungal strains was identified. Effective genes for resistance to pathogen in southern Russia have been identified, which are recommended for breeding programs for the development of blast resistant rice varieties.

Research was conducted with support of grant RFFR № 16-44-230178 «Study of genetic structure of population of *Pyricularia oryzae* Cav. agent and scientific ground of immune and genetic protection of rice crop».

References:

1. Li C. Y., Li J. B., Liu L., et al. Development of minisatellite markers in phytopathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 131: 144-152.
2. Ahn S.N., Kim Y.K., Han S.S., et al. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast. *Rice Genet. Newsl.*, 1996, 13: 74-76.

УДК: 633.81:57.085.2

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ *TEUCRIUM CHAMAEDRIS* И *TEUCRIUM HYRCANICUM* L.

А.С.Саленко

Сочинский институт РУДН, Россия, 357075, Сочи, Чебрикова, 50,
e-mail: VtornikovAndrey@gmail.com

Растения *T. chamaedrys*, *T. hyrcanicum* отбирали в с.Красная воля г. Сочи. Семена проращивали и из семян, выделяли нодальные экспланты для выращивания на питательной среде Мурасаге Скуга. Были получены стерильные культуры, которые подвергали микроразмножению.

Ключевые слова: *T. chamaedrys*, *T. hyrcanicum*, питательная среда, нодальные экспланты

Teucrium - род семейства Lamiaceae. Состоит из 340 видов в мире. Виды *Teucrium* являются многолетними растениями, полукустарниками или кустарниками с привлекательными ароматическими простыми или лопастными листьями, которые могут быть вечнозелеными или листопадными (Ellis, 1999).

Каждому из видов свойственны характерные признаки: *T. chamaedrys* - листья крупно городчато-зубчатые, *T. hyrcanicum* - двугубая чашечка

Исследованиями установлены спазмолитические, антиноцицептивные и противовоспалительные свойства *Teucrium*. Представители этого рода обладают противодиабетическим действием, усиливая секрецию инсулина из

поджелудочной железы. Основные составляющие масла были обнаружены в виде гермакрена D (32,1%), β -Агукариофиллен (14,2%), δ -кадинен (13,1%), бициклогермакрена (6,7%) и β -агфарнезен (4,3%) [1].

Основными видами этого рода на Кавказе являются *T. chamaedrys*, *T. hyrcanicum* и *T. polium*.

В течение очень длительного времени растения этого рода использовались для лечения многих заболеваний, особенно в странах Восточного региона. В последние годы популярность альтернативной медицины снова возросла. Опросы, проведенные в Австралии и США, показывают, что почти 48,5 и 34% респондентов использовали, по крайней мере, одну форму нетрадиционной терапии, включая травяную медицину, соответственно. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) также рекомендовала провести оценку эффективных растений для таких состояний, как диабет, из-за отсутствия безопасных современных лекарств.

Ведущие по этому растению исследования в России пока еще недостаточны. Хотя эти виды не включены в перечень охраняемых, их можно рассматривать как потенциально уязвимые в силу своих биологических особенностей. Исходный материал *T. chamaedrys* и *T. hyrcanicum* собирали в районе Красной Поляны Адлерского района г. Сочи в июле 2018 года в конце цветения. Семена высевали на влажный вермикулит. Всходы появились через 10 дней. 30 дневные сеянцы были стерилизованы и перенесены на питательную среду МС с 1 мг/л кинина и 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты. Было получено 12 стерильных культур, которые были расчеренкованы через 30 дней. Установлен коэффициент размножения $6,1 \pm 0,8$.

Получены стерильные культуры двух видов *Teucrium*. Коэффициент размножения в течение пяти недель составил $6,1 \pm 0,8$ шт.

Литература:

1. Eyup Bagci¹, Ayse Yazgin¹, Sukru Hayta² and Ugur Cakilcioglu. Composition of the essential Oil of *Teucrium chamaedrys* L. (Lamiaceae) from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(23), pp. 2587-2589

UDC: 633.81:57.085.2

THE STUDY OF THE CONDITIONS IN VITRO CULTURE OF PLANT TISSUES TEUCRIUM CHAMAEDRIS AND TEUCRIUM HYRCANICUM L.

A.Salenko

Sochi Institute RUDN, Russia, 357075, sochi, Chebrikova, 50
e-mail: VtornikovAndrey@gmail.com

Plants *T. chamaedrys*, *T. Hyrcanicum* were selected in the village of Krasnaya Volya, Sochi. Seeds were germinated from seedlings, isolated nodal explants for growing on a nutrient medium Murasage Skoog. Were obtained sterile cultures, which were subjected to micropropagation.

Key words: *T. chamaedrys*, *T. Hyrcanicum*, nutrient medium, nodal explants

Teucrium is a genus of the family *Lamiaceae*. Consists of 340 species in the world. *Teucrium* species are perennial, subshrub or shrubs with attractive, aromatic simple or lobed leaves that can be evergreen or deciduous (Ellis, 1999).

Each of the species is characterized by characteristic features: *T. chamaedrys* - large-crested-toothed leaves, *T. hyrcanicum* - double-toed calyx

Studies have established antispasmodic, antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Teucrium*. Representatives of this genus have antidiabetic action, increasing the secretion of insulin from the pancreas. The main components of the oil were detected as hermacrene D (32.1%), β -Arykaryophillen (14.2%), δ -cadinene (13.1%), bicyclohemacrene (6.7%) and β -arpharnesen (4, 3%) [1].

The main species of this genus in the Caucasus are *T. chamaedrys*, *T. hyrcanicum* T. and *T. polium*.

For a very long time, plants of this kind have been used to treat many diseases, especially in the countries of the Eastern region. In recent years, the popularity of alternative medicine has increased again. Surveys conducted in Australia and the United States show that almost 48.5 and 34% of respondents used at least one form of alternative therapy, including herbal medicine, respectively. The World Health Organization (WHO) also recommended that effective plants be evaluated for conditions such as diabetes, due to the lack of safe, modern medicines.

Research on this plant in Russia is still insufficient. Although these species are not included in the list of protected species, they can be considered as potentially vulnerable due to their biological characteristics. The source material *T. chamaedrys* and *T. hyrcanicum* were collected in the Krasnaya Polyana area of the Adlersky district of the city of Sochi in July 2018 at the end of flowering. Seeds were sown on moist vermiculite. Shoots appeared after 10 days. 30 day old seedlings were sterilized and transferred to the nutrient medium MS with 1 mg/l kinein and 0.1 mg/l naphthylacetic acid. 12 sterile cultures were obtained, which were lined up after 30 days. The multiplication factor is 6.1 ± 0.8 .

Sterile cultures of two species of *Teucrium* were obtained. The multiplication factor for five weeks was 6.1 ± 0.8 units.

References:

1. Eyup Bagci¹, Ayse Yazgin¹, Sukru Hayta² and Ugur Cakilcioglu. Composition of the Essential Oil of *Teucrium chamaedrys* L. (*Lamiaceae*) from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4 (23), pp. 2587-2589

УДК 635.21:632.35/38:547.587.11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ОЗДОРОВЛЕНИИ КАРТОФЕЛЯ ОТ ВИРУСНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Федорова Ю.Н., Федорова Л.Н., Тельпук М.Б.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Великолукская государственная сельскохозяйственная академия»

г. Великие Луки, Россия
182112, г. Великие Луки Псковская область, пр. Ленина, д.2
e-mail: наука@vgsa.ru

В работе представлены материалы по оздоровлению отечественных сортов картофеля, полученных в ФГБНУ Ленинградский НИИСХ «Белогорка» вируса М.

Ключевые слова: оздоровленный материал картофеля, салициловая кислота, вирус картофеля М

Картофель по площади производства занимает второе место в мире. Это культура у нас в стране по праву считается вторым хлебом. Однако существуют вопросы, тормозящие развитие отечественного картофелеводства. Одна из основных проблем — это отсутствие качественного посадочного материала перспективных отечественных сортов. В стране работают несколько крупных отечественных школ по выведению сортов картофеля, одна из них находится на Север-Западе в Ленинградском научно-исследовательском институте сельского хозяйства «Белогорка». Среди перспективных сортов полученных этой организацией есть такие сорта как Сиверский, Евразия, Гусар, Майский цветок. Общей проблемой для них является наличие в семенном материале вируса М (PVM). В зависимости от степени поражения семенного материала с этим вирусом можно потерять от 15 до 45%. Оздоровление материала необходимо проводить на начальном этапе, чтобы распространять здоровый посадочный материал. Оздоровление материала картофеля можно проводить с помощью различных препаратов, например, Виразол, Интерферон и другие. Известны успешные попытки применения салициловой кислоты для оздоровления других растений, например, *Triticum aestivum*, *Lupinus luteus* L. и др. Салициловая кислота выделяется разнотипностью воздействия, она стимулирует одни процессы и подавляет другие, обладает свойствами фитогормона, способного функционировать в растении в качестве компонента сигнальных систем клеток, ответственных не только за формирование фитоиммунитета, но и за адекватный ответ на действие абиотических стрессоров.

Целью нашей работы было изучение влияния салициловой кислоты на оздоровление сортов картофеля от вируса М. Работа проводилась в лаборатории клонального микроразмножения растений картофеля Великолукской государственной сельскохозяйственной академии с 2017 по 2019 годы. Растения *in vitro* культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга содержащей салициловую кислоту (СК). Тестирование на вирусы проводили методом ИФА и ИХА.

В результате проведенных экспериментов наиболее эффективная доза для оздоровления от вируса М содержала салициловую кислоту в концентрации от 1,5 до 2 мг/л. На этой питательной среде получено наибольшее количество здоровых регенерантов. Эта тенденция сохранилась при дальнейшем клональном размножении. Таким образом, салициловая кислота играет роль в индукции комплекса защитных реакций, повышает устойчивость растений к заболеваниям.

Литература:

- 1.Белозерова Н.С. Влияние цитокининов и салициловой кислоты на экспрессию генов митохондриальных белков: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Москва, 2010. – 25с.
- 2.Плотникова Л.Я. Влияние салициловой и янтарной кислот на цитоплазматические реакции пшеницы, инфицированной бурой ржавчиной //Цитология. - 2009. - Том 51, № 1. - С.43-52.

UDC 635.21:632.35/38:547.587.11

SALICYLIC ACID USE IN POTATO RECOVERY FROM BACTERIAL AND VIRAL INFECTION

Fyodorova Yu.N., Fyodorova L.N., Telpuk M.B.

“State Agricultural Academy of Velikie Luki” State Federal Budget-funded Educational Establishment of Higher Education Velikie Luki, Russia
182112, Velikie Luki, Pskov oblast, 2 Lenin Ave.,
e-mail: nauka@vgsa.ru

The article presents materials on the recovery of home potato varieties grown by the Leningrad NIISH “Belogorga” from M virus.

Key words: recovered potato material, salicylic acid, potato virus M

As for the areas taken by potato in the world it holds the second place. This crop is by right considered in this country to be another bread. However, there are problems hampering a further potato growing development. One

of those is an insufficiency of prospective quality home grown planting material. Several large potato breeding institutions are working currently in the country, one of them being the "Belogorka" Leningrad Agricultural Research Institute situated in the North-West of Russia. Prospective potato varieties bred by the institution include "Siverskii", "Eurasia", "Husar", "Maiskii Tsvetok". A general problem with the above varieties is the M (PVM) virus that infests the planting material. From 15 to 45% can be lost depending on the degree the material is infested. Material recovery is to be carried out at the initial stage to be able to get virus-free material for further proliferation. Various substances can be used for the potato recovery, e.g., Virasol, Виразол, Interpheron and others. Successful experience is also available for the salicylic acid use in recovering other plants, such as *Triticum aestivum*, *Lupinus luteus* L. etc. Salicylic acid is characterised with its multi-factor effect, stimulating some processes while suppressing others. It possesses phytohormone qualities that can function in the plant as a component of cell signal system that are responsible not only for phytoimmunity formation but also for the response to the action of abiotic stressors.

The goal of our research has been studying the effect of the salicylic acid on potato varieties recovery the M virus. The research was conducted in the State Agricultural Academy of Velikie Luki Laboratory for potato microclonal proliferation in the years 2017 – 2019. Plants in vitro have been grown on the Murasige-Skouga nutrient medium containing the salicylic acid (SA). Virus testing has been done with ELISA and Immunochromatography methods.

Salicylic acid doses of 1,5 - 2 mgr/l have been found most effective the potato recovery of the M virus. The better part of recovered plants has been received when using the mentioned nutrient medium, which further on told on the clonal stage.

Summarising, the salicylic acid acts as an inductor for a complex of the plant protective responses, increasing the plant resistance to diseases.

References:

1. Belozeroва N.S. Vliyanie citokininov i salicilovoy kisloty na ehkspressiyu genov mitohondrial'nyh belkov: Avtoref dis. kand. biol.nauk. – Moskva, 2010. – 25s.
2. Plotnikova L.YA. Vliyanie salicilovoy i yantarnoy kisloty na citofizicheskie reakcii pshenicy, inficirovannoy buroj rzhavchiny //Citologiya.- 2009.- Tom 51, № 1. - S.43-52.

УДК 582.675.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФРАГМЕНТАРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЯДЕРНОЙ (ITS1-ITS2) И ХЛОРОПЛАСТНОЙ (rbcL, trnL-F) ДНК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ МЕЖДУ РОДАМИ В СЕМЕЙСТВЕ RANUNCULACEAE JUSS.

И.Ю. Евдокимов

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия
656049, Барнаул, пр. Ленина, 61
e-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

Приведены результаты исследования филогенетических отношений между родами семейства Ranunculaceae Juss., используя фрагменты хлоропластных (rbcL, trnL-f) последовательностей генов и ядерных последовательностей ДНК (ITS1-ITS2).

Ключевые слова: филогения Ranunculaceae Juss, генетическое родство, rbcL, trnL-f, ITS1-ITS2 последовательности

Использовались 63 последовательности trnL-f (включая 18 отсекуированных самостоятельно), 42 последовательности по rbcL гену (7 отсекуировано самостоятельно, 2 добавлено в дендрограммы). В качестве материалов ITS1-ITS2 были взяты 130 последовательностей разных видов представителей семейства Ranunculaceae и 2 представителя Outgroup по одному из семейств Paeoniaceae и Berberidaceae из генетических баз данных (NCBI).

Целью нашего исследования явилось изучение филогении и таксономии семейства Ranunculaceae в целом, при помощи методов молекулярной биологии с использованием фрагментов хлоропластной и ядерной ДНК, в частности rbcL, trnL-F, ITS1-ITS2. Для построения дендрограмм были взяты уже имеющиеся последовательности из ведущих генетических банков (EMBL-EBI, NCBI), а так же часть видов растений была отобрана из гербарного материала Южно-Сибирского ботанического сада. После чего нами проводились

стандартные методики выделения из них ДНК, амплификации необходимых фрагментов, секвенирование амплификатов. Все работы проводились в лаборатории биоинженерии Южно-Сибирского ботанического сада. Были расшифрованы последовательности порядка 25 видов растений для дополнения остального набора сиквенсов (Евдокимов, 2017).

Для исследования филогении семейства нами строились дендрограммы на основе данных молекулярной биологии. Наши деревья, построенные на основе последовательностей хлоропластных и ядерных генов наглядно разделяются на клады, по количеству которых, а также по проценту расхождения мы можем судить о составе таксономическом составе семейства *Ranunculaceae* Juss. Генетическая поддержка разделения на клады различна, но вполне достаточна для определения их в разные филогенетические группы. На их основе мы предлагаем выделить эти группы в ранг подсемейств. Это такие группы, как *Hydrastidoideae*, *Glaucidoideae*, *Coptidoideae*, *Isopyroideae*, *Thalictroideae*, *Aconitoideae*, *Callianthemoideae*, *Trollioideae*, *Calthoideae*, *Actaeaceae*, *Helleboroideae*, *Nigelloideae*, *Anemonoideae*, *Ranunculoideae*.

С учетом полученных молекулярно-генетических данных нами построена новая система семейства *Ranunculaceae*, которая дополняет представление о системе изучаемого семейства и подтверждает ранние исследования. Она включает в себя 14 подсемейств, 26 триб и 61 род.

Литература:

1. Евдокимов И.Ю. Молекулярная филогения семейства *Ranunculaceae* на основе *rbcl* и *trnl-f* последовательностей хлоропластной ДНК// Сборник научных статей по материалам XVI международной научно-практической конференции «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии», 2017. – С. 240-245.

UDC 582.675.1

USING FRAGMENTAL SEQUENCES OF NUCLEAR (ITS1-ITS2) AND CHLOROPLASTIC (RBCL, TRNL-F) DNA FOR THE STUDY OF PHYLOGENETIC RELATIONS BETWEEN RODES IN THE FAMILY OF *RANUNCULACEAE* JUSS.

I.Yu. Evdokimov

Altai State University, Barnaul, Russia
656049, Barnaul, Lenin Ave., 61
e-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

The results of the study of phylogenetic relationships between the genera of the family *Ranunculaceae* Juss. Are given, using fragments of chloroplast (*rbcl*, *trnl-f*) gene sequences and nuclear DNA sequences (ITS1-ITS2).

Key words: phylogeny of *Ranunculaceae* Juss, genetic relationship, *rbcl*, *trnl-f*, ITS1-ITS2 sequences

63 *trnl-f* sequences were used (including 18 sequenced on their own), 42 sequences on the *rbcl* gene (7 sequenced on their own, 2 added to dendrograms). As materials ITS1-ITS2, 130 sequences of different species of the representatives of the family *Ranunculaceae* and 2 representatives of the Outgroup were taken from one of the *Paeniaceae* and *Berberidaceae* families from the genetic databases (NCBI).

The aim of our study was to study phylogeny and taxonomy of the *Ranunculaceae* family as a whole, using molecular biology methods using chloroplast and nuclear DNA fragments, in particular *rbcl*, *trnl-f*, ITS1-ITS2. To build dendrograms, existing sequences from leading genetic banks (EMBL-EBI, NCBI), as well as some plant species were selected from herbarium material of the South Siberian Botanical Garden. After that, we carried out standard techniques for isolating DNA from them, amplifying the necessary fragments, sequencing amplifications. All work was carried out in the laboratory of bioengineering of the South-Siberian Botanical Garden. The sequences of about 25 species of plants were decoded to complement the rest of the sequence of sequences (Evdokimov, 2017).

To study the phylogeny of the family, we constructed dendrograms based on molecular biology data. Our trees, built on the basis of sequences of chloroplast and nuclear genes, are clearly divided into clades, by the number of which, as well as by the percentage of divergence, we can judge the composition of the taxonomic composition of the family *Ranunculaceae* Juss. Genetic support for clade separation is different, but quite sufficient for defining them into different phylogenetic groups. Based on them, we propose to allocate these groups to the rank of subfamilies. These groups include *Hydrastidoideae*, *Glaucidoideae*, *Coptidoideae*, *Isopyroideae*, *Thalictroideae*, *Aconitoideae*, *Callianthemoideae*, *Trollioideae*, *Calthoideae*, *Actaeaceae*, *Helleboroideae*, *Nigelloideae*, *Anemonoideae*, *Ranunculoideae*.

Taking into account the obtained molecular genetic data, we have constructed a new system of the

Ranunculaceae family, which complements the concept of the system of the family under study and confirms early studies. It includes 14 subfamilies, 26 tribes and 61 genera.

References:

1. Evdokimov I.Yu. Molecular phylogeny of the Ranunculaceae family based on *rbcl* and *trnL-f* sequences of chloroplast DNA // Collection of scientific articles on the materials of the XVI International Scientific and Practical Conference "Problems of Botany of Southern Siberia and Mongolia", 2017. - P. 240-245.

УДК 615.322:582. 579.2:581.192

НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (НА ПРИМЕРЕ *IRIS L.* И *POTENTILLA L.*)

Тихомирова Л.И.¹, Базарнова Н.Г.¹, Ильичева Т.Н.², Мартиросян Ю.Ц.³

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049 (Россия),
e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

²ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, (Россия),

³ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, ул. Тимирязевская, д. 42, Москва, 127422, (Россия)

Разработана научно обоснованная технология получения лекарственного растительного сырья представителей *Iris L.* и *Potentilla L.* на основе гидропоники сопряжённой с клональным микроразмножением для получения биомассы (10,5-23,4 кг/м²), ее компонентов и продуктов метаболизма.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырьё, биотехнология получения, направленный синтез БАС

Во всём мире растёт предпочтение потребителей к лекарственным препаратам на растительной основе, которые не вызывают токсичности при передозировке и имеют меньше побочных эффектов. При этом FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) ежегодно публикует безвозвратные потери видов растений, в том числе лекарственных, в связи с варварскими методами заготовки [1, 2, 3].

Цель данной работы являлось научное обоснование разработки биотехнологии производства растительного сырья представителей родов *Iris L.* и *Potentilla L.* для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений на основе клонального микроразмножения и гидропонного выращивания.

Изучение морфогенетических процессов на тканевом уровне у регенерантов ириса подтвердило в основном аналогичность их прохождения у интактных растений. Организация специализированных тканей (гидроцитной системы) и активизация зон эндогенного геммогенеза и ризогенеза зависела от содержания цитокинина в питательной среде и определяла потенциал выживания растений в условиях *in vitro* и в дальнейшем *ex vitro*. Гидроциты дифференцируются из клеток постоянных тканей (подобно феллогену), способствуют проведению метаболитов в области гистогенеза и органогенеза и образуют «мостики» между материнскими тканями экспланта и клетками прокамбия. Таким образом проявляются механизмы морфогенеза, как ответ на биохимический состав питательной среды и физиологическое состояние материнского растения.

Установлено, что интактные растения и растения-регенеранты *Iris sibirica* и *Potentilla alba* имели идентичный групповой состав биологически активных соединений. Разработанная технология позволяет в результате направленного биосинтеза увеличить в 2 раза содержание экстрактивных веществ в биомассе *I. sibirica* при выращивании на средах с 2,5 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП), и в 1,3 раза увеличить содержание флавоноидов на средах с 7,5 мкМ БАП. А сырьё для получения экстракта *I. sibirica* с противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса II типа, необходимо выращивать на средах содержащих 5,0-10,0 БАП +1,0 мкМ НУК+0,1 мкМ ИМК.

Методом спектрального анализа на ИСП-спектрометре показана особенность биотехнологического сырья *I. sibirica* и *P. alba* в накоплении разнообразных макро- и микроэлементов. Методом ВЭЖХ найдены следующие группы биологически активных соединений, соответствующие роду *Iris L.*: фенилпропеновые кислоты (кумаровая и феруловая кислота и их производные), флавоноиды (С-гликозид апигенина, апигенин-7-О-гликозид), изофлавоноиды, фенолокислоты (ванилиновая кислота), негидролизующиеся флавонои-

ды-гликозиды (гликозиды кемпферола и апигенина), стильбены.

Доказано содержание мангиферина в биомассе *Iris sibirica* L. Водные и спиртовые экстракты биотехнологического сырья *I. sibirica* и *P. alba* проявляли противовирусную активность в отношении вируса герпеса. При невысокой токсичности экстракты имели относительно высокий индекс селективности.

Литература:

1. Medicinal Plants Industry 2017 // <http://tejasiblog.blogspot.ru/2017/05/medicinal-plants-industry-2017.html>
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations // <http://www.fao.org/biodiversity/2010-international-year-of-biodiversity/en/>
3. Обзор российского рынка лекарственных трав и сборов // <http://www.marketcenter.ru/content/doc-2-10792.html>

UDC 615.322:582. 579.2:581.192

THE SCIENTIFIC RATIONALE FOR THE DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGY PRODUCTION OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL (FOR EXAMPLE, IRIS L. AND POTENTILLA L.)

Tikhomirova L.I.¹, Bazarnova N.G.¹, Ilicheva T.N.², Martirosian Iu.Ts.³

¹Altai State university, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia),

e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

²State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 (Russia);

³All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya st., 42, Moscow, 127422 (Russia)

A scientifically based technology for the preparation of medicinal plant raw materials of representatives of the representatives of the *Iris* L. and the *Potentilla* L. is developed on the basis of hydroponics coupled with clonal micropropagation for the production of biomass (10,5-23,4 kg/m²) and its components, of the products of metabolism.

Key words: medicinal plant raw materials, biotechnology of production, directed biosynthesis

Worldwide, there is a growing consumer preference for herbal medicines that do not cause overdose toxicity and have fewer side effects. Thus FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) published annually by the irretrievable losses of species of plants, including medicinal, in connection with the brutal methods of procurement [1, 2, 3].

The purpose of this work was the scientific justification for the development of biotechnology for the production of plant raw materials of representatives of the genera of the genus *Iris* L. and *Potentilla* L. for the production of biomass, its components, products of metabolism, directed biosynthesis of biologically active compounds based on micropropagation and hydroponics.

The study of morphogenetic processes at the tissue level in iris regenerants confirmed the similarity of their passage in intact plants. The organization of specialized tissues (hydrocyte system) and activation of zones of endogenous hemogenesis and rhizogenesis depended on the content of cytokinin in the nutrient medium and determined the survival potential of plants *in vitro* and in the future *ex vitro*. Hydrocity differentiate from the cells of permanent tissues (like phellogen), promote the metabolites in the field of histogenesis and organogenesis to form "bridges" between the maternal tissues and Explant cell programme. Thus, the mechanisms of morphogenesis are manifested as a response to the biochemical composition of the nutrient medium and the physiological state of the parent plant.

It was found that intact plants and regenerative plants *Iris sibirica* and *Potentilla alba* had identical group composition of biologically active compounds. The developed technology allows as a result of directed biosynthesis to increase the content of extractive substances in the biomass by 2 times, and to increase the content of flavonoids on media with 2.5 µM of 6-benzylaminopurine (BAP) by 1.3 times on media with 7.5 µM of BAP. And raw materials for the production of extract *I. sibirica* with antiviral activity against herpes simplex virus type II should be grown on media containing 5.0-10.0 BAP + 1.0 µM NNA + 0.1 µM IBA.

By the method of spectral analysis on the spectrometer the peculiarity of biotechnological raw materials is shown in the accumulation of various macro - and microelements. The following groups of biologically active compounds were found by HPLC method, corresponding to the genus of the l-phenylpropanoid acids (coumaric and ferulic acid and their derivatives), flavonoids (apigenin C-glycoside, apigenin-7-O-glycoside), isoflavonoids, phenolic

acids (vanillic acid), nonhydrolyzable flavonoids (glycosides of kaempferol and apigenin), stilbene.

The content of mangiferin in the biomass of the *Iris sibirica* L. Water and alcohol extracts of the biotechnological raw materials of the virus showed the antiviral activity of the herpes virus. The low toxicity of the extracts had a relatively high index of selectivity.

References:

1. Medical Plants Industry 2017 // <http://tejasiblog.blogspot.ru/2017/05/medicinal-plants-industry-2017.html>
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations // <http://www.fao.org/biodiversity/2010-international-year-of-biodiversity/en/>
3. Review of the Russian market of medicinal herbs and fees // <http://www.marketcenter.ru/content/doc-2-10792.html>

УДК: 577.218

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБОВ РАЗМНОЖЕНИЯ И ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ IN VITRO

Творогова В.Е., Кудряшов А.А., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, кафедра Генетики и Биотехнологии,
e-mail: krubaza@mail.ru

Обнаружен ряд белков-участников соматического эмбриогенеза. Ведётся работа по получению растений *Medicago truncatula* с потерей функции этих генов с помощью геномного редактирования.

Ключевые слова: регенерация, соматический эмбриогенез, *Medicago truncatula*, WOX, NF-Y

Методы культивирования растений в условиях *in vitro* являются неотъемлемой частью современной биотехнологии. Они широко применяются при получении генетически модифицированных растений, для редактирования генома, а также для получения большого числа растений с идентичным генотипом в короткие сроки. Основными способами размножения растений *in vitro* являются такие виды регенерации как соматический эмбриогенез и органоогенез (регенерация корней и побегов). Несмотря на то, что протоколы получения регенерантов в культуре *in vitro* разработаны для множества видов растений, в применении этих методик существует множество ограничений; например, зачастую для тех или иных способов регенерации подходят только определенные линии или сорта растений, или же имеющиеся протоколы занимают чересчур продолжительное время.

В связи с этим, важной областью биотехнологии является оптимизация методов регенерации растений *in vitro* – расширение спектра используемых генотипов, сокращение сроков регенерации, а также упрощение самих методик. Несомненно, для перечисленных улучшений крайне полезным является знание молекулярно-генетических механизмов регенерации.

Наши исследования посвящены изучению механизмов одной из разновидностей регенерации – соматического эмбриогенеза – на модели люцерны усеченной (*Medicago truncatula*). Мы обнаружили участников соматического эмбриогенеза среди важнейших регуляторных белков растений – транскрипционных факторов из групп WOX и NF-Y. Так, белок MtWOX9-1, согласно нашим данным, способен стимулировать процесс соматического эмбриогенеза.

В настоящее время мы проводим работу по геномному редактированию *Medicago truncatula* для получения линий с потерей функции обнаруженных нами генов-участников соматического эмбриогенеза.

UDC: 577.218

OPTIMIZATION OF METHODS OF PLANT REPRODUCTION AND TRANSFORMATION IN VITRO

Tvorogova V.E., Kudryashov A.A., Lutova L.A.

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation
199034, St. Petersburg, Universitetskaya emb., 7/9, Department of Genetics and Biotechnology,
e-mail: krubaza@mail.ru

Several proteins, participating in somatic embryogenesis, are discovered. Research is performed for obtaining *Medicago truncatula* plants with loss-of-function of these genes, using methods of genome editing.

Key words: regeneration, somatic embryogenesis, *Medicago truncatula*, WOX, NF-Y

Methods of *in vitro* cultivation of plants are an integral part of modern biotechnology. They are widely used for obtaining genetically modified plants, editing the plant genomes, as well as for obtaining a large number of plants with an identical genotype in a short time period. The main pathways of plant reproduction *in vitro* are two types of regeneration: somatic embryogenesis and organogenesis (regeneration of roots and shoots). Despite the fact that protocols for obtaining regenerants in the *in vitro* culture have been developed for many plant species, there are many limitations in the application of these techniques; for example, often certain protocols of regeneration are suitable only for certain plant lines or cultivars, or the available protocols are too time-consuming. In this regard, an important area of biotechnology is the optimization of plant regeneration methods *in vitro*: expanding the range of genotypes used, reducing the time for regeneration, as well as simplifying the methods themselves. Undoubtedly, knowledge of the molecular and genetic mechanisms of regeneration is extremely useful for these improvements.

Our studies are devoted to studying the mechanisms of one of the types of regeneration – somatic embryogenesis – on the model of barrel medic (*Medicago truncatula*). We found participants of somatic embryogenesis among important plant regulatory proteins – transcription factors from the WOX and NF-Y groups. Thus, according to our data, MtWOX9-1 protein is able to stimulate the process of somatic embryogenesis. We are currently working on the genomic editing of the *Medicago truncatula* to obtain lines with the loss-of-function of genes which, as we detected, participate in somatic embryogenesis.

УДК 636.4:578:577.2.08:51-76

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ МЫШИНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С ГЕНАМИ РЕЦЕПТОРА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ (ELR1) И ЦИКЛИНА T1 (eCT1) ЛОШАДИ

Савченкова И.П., Савченкова Е.А.

«Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко Российской академии наук», (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия

109428, Москва, Рязанский проспект, д.24, корп. 1

e-mail: s-ip@mail.ru

Получены стабильные генетически трансформированные мышинные клетки линии STO с генами рецептора вируса инфекционной анемии (ELR1) и циклина T1 (eCT1) лошади. Экспрессия генов ELR1 и eCT1 лошади в мышинных фибробластах подтверждена на уровне транскрипции по наличию мРНК целевых генов.

Ключевые слова: вирус инфекционной анемии лошадей, ген рецептора вируса инфекционной анемии лошадей (ELR1), ген циклина T1 (eCT1), трансфекция, генетическая трансформация клетки, мышинные эмбриональные фибробласты, *in vitro*

Создание новых клеточных систем с заданными свойствами на основе клеток млекопитающих, подвергнутых генетической трансформации *in vitro*, актуально для ветеринарной вирусологии и биотехнологии, в связи с чем получение отечественных культур клеток с заданными свойствами и их депонирование является одним из приоритетных направлений в этой области на современном этапе. Целью настоящей работы было получение мышинных эмбриональных фибробластов с генами рецептора вируса инфекционной анемии (ELR1) и циклина T1 (eCT1) лошади. Получение стабильной генетически-трансформированной мышинной клеточной линии с данными генами позволит решить фундаментальный вопрос о роли рецептора вируса инфекционной анемии лошадей в тропизме вируса.

В эксперименте использовали перевиваемую линию эмбриональных фибробластов мыши STO. Плазмиды pcDNA3.1-ELR1 и pcDNA3.1-сусT1 были предоставлены профессором Xiaojun Wang (Harbin Veterinary Research Institute, CAAS) по просьбе профессора Савченковой И.П.. Плазида pcDNA3.1-ELR1 содержала н.п. гена ELR1 лошади, а pcDNA3.1-сусT1 н.п. гена циклина T1 (eCT1) лошади, поставленные под контроль промотора цитомегаловируса (CMV) человека и селективного гена *neo*. Трансфекцию про-

водили кальций-фосфатным методом, с помощью набора K2780-1 фирмы Invitrogen согласно инструкции. Временную экспрессию целевых экзогенных генов идентифицировали через 48 часов после трансфекции в реакции ПЦР. Для этого использовали прямые и обратные праймеры ELR1IN-F/ELR1IN-R и eCT1IN-F/eCT1IN-R. Эти же праймеры использовали для определения ДНК плазмид в генетически-трансформированных клонах с фенотипом [neo^r]. Для выделения ДНК использовали набор «К-Сорб» фирмы Синтол, Россия. Оценку экспрессии целевых генов проводили по определению наличия синтеза специфических мРНК в клетках. Продукт экспрессии генов *ELR1* и *eCT1* определяли по мРНК в реакции ОТ-ПЦР с использованием специфичных праймеров.

Результаты проведенных экспериментов продемонстрировали компетентность клеток линии STO к поглощению чужеродной ДНК кальций-фосфатным методом трансфекции, с последующим ДМСО шоком. Молекулярно-генетический анализ этих клеток обнаружил наличие в них ДНК целевых генов: *ELR1* и *eCT1*. Суммарно в двух экспериментах было получено 57 клонов резистентных к генетицину, из них в 8 были обнаружены мРНК генов *ELR1* и *eCT1*, что составляет 14 %. Частота генетической трансформации STO составляла $2,8 \times 10^{-5}$. Встраивание генов в геном клеток выявляли в ПЦР с геноспецифическими праймерами с последующим нуклеотидным секвенированием, используя в качестве матрицы ДНК, выделенную из клеток. Экспрессия генов *ELR1* и *eCT1* лошади в мышинных фибробластах была подтверждена на уровне транскрипции по наличию мРНК целевых генов в реакции ОТ-ПЦР. Полученные клоны были размножены и заморожены.

Таким образом, нами созданы клетки с заданными свойствами, посредством генетической трансформации, которые могут быть использованы в качестве фидерных слоев для создания и культивирования генетически-трансформированных ЭСК, а также для решения фундаментального вопроса о роли рецептора вируса ИНАН в тропизме вируса. Полученная стабильная клеточная линия депонирована в коллекцию перевиваемых соматических культур сельскохозяйственных и промысловых животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ.

UDC 636.4:578:577.2.08:51-76

OBTAINING A STABLE MOUSE GENETIC TRANSFORMED CELL LINE WITH GENES OF THE RECEPTOR FOR EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS (ELR1) AND CYCLIN T1 (ECT1)

Savchenkova I.P., Savchenkova E.A.

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center VIEV", Russia, Moscow, Ryazanskiy Ave, 24/1
e-mail: s-ip@mail.ru

Stable genetically transformed mouse cells of STO line with genes of infectious anemia virus receptor (*ELR1*) and cyclin T1 (*eCT1*) were obtained. The expression of equine *ELR1* and *eCT1* genes in mouse fibroblasts was confirmed at the transcriptional level by the presence of the mRNA of the target genes.

Key words: equine infectious anemia virus, gene of receptor for equine infectious anemia virus, equine cyclin gene (*ELR1*), equine cyclin T1 (*eCT1*), transfection, genetic transformation, mouse embryonic fibroblasts, *in vitro*

The creation of new cell systems with desired properties on the basis of mammalian cells subjected to genetic transformation *in vitro* is relevant for veterinary virology and biotechnology, and therefore the production of Russian cellular culture with desired properties and their deposition is one of the priorities in this area at the present stage. The aim of this work was to obtain mouse embryonic fibroblasts with the genes of the receptor for the equine infectious anemia virus (*ELR1*) and cyclin-T1 (*eCT1*). Obtaining stable genetically transformed mouse cell line with these genes will allow solving the fundamental question of the role of the receptor for the equine infectious anemia virus in the tropism.

In the experiment, a continuous mouse embryonic fibroblasts line (STO) was used. Plasmids pcDNA3.1-ELR1 and pcDNA3.1-cycT1 were provided by Professor Xiaojun Wang (Harbin Veterinary Research Institute, CAAS) by the request of Professor I.P. Savchenkova. The pcDNA3.1-ELR1 plasmid contained b.s. of the *ELR1* gene, and pcDNA3.1-cyclinT1 contained b.s. equine cyclin T1 (*eCT1*) gene under the control of the human cytomegalovirus (CMV) promoter and the selective *neo* gene. Transfection was performed by the calcium phosphate method using K2780-1 kit (Invitrogen) according to the instructions. The transient expression of target exogenous genes was identified 48 hours after transfection by the PCR reaction. For this purpose, forward and reverse primers ELR1IN-f/

ELR1IN-R and eCT1IN-f/eCT1IN-R were used. The same primers were used for the determination of plasmid DNA in genetically transformed clones with the [neo+] phenotype. For DNA extraction, a "K-Sorb" kit (Synthol, Russia) was used. Evaluation of the expression of target genes was performed based on the presence of the synthesis of specific mRNA in cells. The product of the expression of *ELR1* and *eCT1* genes was determined based on mRNA in the RT-PCR reaction using specific primers.

The competence of STO cells to the absorption of foreign DNA by calcium phosphate transfection method, followed by DMSO shock was established. The molecular genetic analysis of these cells revealed the presence of DNA of target *ELR1* and *eCT1* genes. In total, 57 clones resistant to genitcin were obtained in two experiments, out which eight contained the mRNA of the *ELR1* and *eCT1* genes, which was 14 %. The frequency of genetic transformation of STO cells was 2.8×10^{-5} . The integration of genes into the cell genome was detected by PCR using gene-specific primers with subsequent nucleotide sequencing using DNA isolated from cells as the matrix. The expression of equine *ELR1* and *eCT1* genes in mouse fibroblasts was confirmed at the transcriptional level by the presence of the mRNA of the target genes in the RT-PCR reaction. The resulting clones were propagated and frozen.

Thus, we produced cells with the desired properties, using genetic transformation that can be used as feeder layers for the production and cultivation of genetically transformed embryonic stem cells as well as to solve the fundamental question about the role of the receptor of equine infection anemia virus in the virus tropism. The obtaining stable cell line is deposited in the collection of continuous somatic cultures of agricultural and game animals of FSC VIEV.

УДК 577.121

ПОТЕНЦИАЛ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОГО БИОСИНТЕЗА (S)-(+)-1,3-БУТАНДИОЛА ПО ОБРАЩЕНОМУ ПУТИ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.

ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Москва, Россия, 117545, Москва, 1-ый Дорожный проезд д.1;
e-mail: gulevich@genetika.ru

Показано участие (S)-специфичного фермента в формировании ключевого метаболита предшественника в рекомбинантном штамме *E. coli* способном синтезировать 1,3-бутандиол из глюкозы по обращенному пути бета-окисления жирных кислот.

Ключевые слова: 1,3-бутандиол, бета-окисление жирных кислот, *Escherichia coli*, метаболическая инженерия

Стереоизомеры 1,3-бутандиола – удобные хиральные синтоны для получения ряда сельскохозяйственно значимых агрохимикатов, таких как пестициды, инсектициды и феромоны. В то время как стереоселективный химический синтез алифатических диолов остается нетривиальной и трудоемкой задачей, развитие методов геномного редактирования и направленной метаболической инженерии открывает, в настоящее время, возможность микробиологического синтеза соответствующих хиральных соединений с высокой степенью энантиомерной чистоты. 1,3-бутандиол не является метаболитом в норме секретируемым известными микроорганизмами при утилизации сахаров, традиционных субстратов микробной биотехнологии. Однако, с помощью направленно сконструированного штамма BOX-3' Δ3 (MG1655 IacI^{R} $\text{P}_{\text{trc-ideal-4}}$ -SD $_{\text{phi10}}$ -adhE(Glu568Lys), P_{L} -SD $_{\text{phi10}}$ -atoB, $\text{P}_{\text{trc-ideal-4}}$ -SD $_{\text{phi10}}$ -fadB, $\text{P}_{\text{trc-ideal-4}}$ -SD $_{\text{phi10}}$ -fadE, DackA-pta, DroxB, AldhA) ранее нами была продемонстрирована принципиальная возможность биосинтеза 1,3-бутандиола из глюкозы клетками *E. coli* в результате обращения нативного для организма пути бета-окисления жирных кислот. Потенциально, в клетках *E. coli* формирование ключевого предшественника в биосинтезе 1,3-бутандиола, 3-гидроксibuтирил-КоА, может катализироваться различными ферментами, конвертирующими ацетоацетил-КоА в соответствующее (S)- или (R)-гидроксипроизводное. Помимо (S)-специфичной 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы бета-окисления жирных кислот, FadB, к этим ферментам относятся также (R)-специфичная 3-кетоацил-АПБ редуктаза биосинтеза жирных кислот, FabG, и обладающая неизвестной стереоспецифичностью 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназа пути деградации фенилацетата, РааН. С целью оценки вклада соответствующих ферментов в биосинтез 1,3-бутандиола

сконструированным штаммом, гены *fadB* и *paaH* были индивидуально и в совокупности инактивированы в штамме BOX-3' Δ3. Ген *fabG* был оставлен интактным в конструируемых штаммах, поскольку активность 3-кетоацил-АПБ редуктазы является жизненно-важной для клеток *E. coli*. Инактивация гена *paaH* не оказывала влияния на синтез 1,3-бутандиола соответствующим штаммом BOX-3' Δ3 Δ*paaH* в сравнении с родительским. Вместе с тем, инактивация гена *fadB* приводила к отмене синтеза целевого вещества штаммами BOX-3' Δ3 Δ*fadB* и BOX-3' Δ3 Δ*paaH* Δ*fadB*. Таким образом, ни 3-кетоацил-АПБ редуктаза *FabG*, ни 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназа *PaaH* не принимали участия в биосинтезе 1,3-бутандиола штаммом BOX-3' Δ3 и синтез 3-гидроксибутирил-КоА в штамме осуществлялся (S)-специфичным ферментом бета-окисления жирных кислот, 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназой *FadB*. Полученные данные свидетельствуют о том, что в результате обращения пути бета-окисления жирных кислот в рекомбинантных штаммах *E. coli* может быть обеспечен преимущественный биосинтез из глюкозы (S)-стереоизомера 1,3-бутандиола.

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

UDC 577.121

POTENCIAL OF ESCHERICHIA COLI FOR STEREOSELECTIVE BIOSYNTHESIS OF (S)-(+)-1,3-BUTANEDIOL THROUGH THE INVERTED FATTY ACID BETA-OXIDATION PATHWAY

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

State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia
117545, Moscow, 1-st Dorozhny pr., 1
e-mail: gulevich@genetika.ru

The participation of (S)-specific enzyme in the formation of the key precursor metabolite in recombinant *E. coli* strain capable of synthesizing 1,3-butanediol from glucose through the inverted fatty acid beta-oxidation pathway has been demonstrated.

Key words: 1,3-butanediol, *Escherichia coli*, fatty acid beta-oxidation, metabolic engineering

Stereoisomers of 1,3-butanediol are useful chiral synthons for the production of a number of valuable agrochemicals, such as pesticides, insecticides, and pheromones. While the stereoselective chemical synthesis of aliphatic diols still represents a challenging task, the rapid development of the genome editing and metabolic engineering methodology allows nowadays for the development of the microbial processes for the synthesis of the respective compounds with the high enantiomeric purity. 1,3-butanediol is not a metabolite normally secreted by the known microorganisms upon the utilization of sugars, traditional substrates in microbial biotechnology. Nevertheless, using the directly engineered strain BOX-3' Δ3 (MG1655 lacI^q $P_{\text{trc-ideal-4}}\text{-SD}_{\text{phi10}}\text{-adhE(Glu568Lys)}$, $P_{\text{L}}\text{-SD}_{\text{phi10}}\text{-atoB}$, $P_{\text{trc-ideal-4}}\text{-SD}_{\text{phi10}}\text{-fadB}$, $P_{\text{trc-ideal-4}}\text{-SD}_{\text{phi10}}\text{-fadE}$, Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*) we have previously demonstrated the feasibility of the 1,3-butanediol biosynthesis from glucose in *E. coli* resulting from the reversal of the native fatty acid beta-oxidation pathway. In *E. coli* the formation of the key precursor metabolite in 1,3-butanediol biosynthesis, 3-hydroxybutyryl-CoA, can potentially be catalyzed by different enzymes converting acetoacetyl-CoA in either respective (S)- or (R)-hydroxy-derivative. Besides (S)-specific 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase of fatty acid beta-oxidation, *FadB*, these are, also, (R)-specific 3-ketoacyl-ACP reductase of fatty acid biosynthesis, *FabG*, and 3-hydroxyadipyl-CoA dehydrogenase of phenylacetate degradation, *PaaH*, which possesses unknown stereospecificity. To evaluate the contribution of the respective enzymes in 1,3-butanediol biosynthesis by the engineered strain, the genes *fadB* and *paaH* were individually or concomitantly inactivated in the strain BOX-3' Δ3. The gene *fabG* was kept intact in the strains since the activity of 3-ketoacyl-ACP reductase is essential for *E. coli*. The inactivation of the gene *paaH* did not affect the 1,3-butanediol biosynthesis by the respective strain BOX-3' Δ3 Δ*paaH* compared to the parent strain. At the same time, the inactivation of *fadB* led to the abolishment of the synthesis of the target compound by the strains BOX-3' Δ3 Δ*fadB* and BOX-3' Δ3 Δ*paaH* Δ*fadB*. Thus, neither 3-ketoacyl-ACP reductase *FabG* nor 3-hydroxyadipyl-CoA dehydrogenase *PaaH* participated in the biosynthesis of 1,3-butanediol by the strain BOX-3' Δ3 and the formation of 3-hydroxybutyryl-CoA in the strain was catalyzed by the (S)-specific enzyme of fatty acid beta oxidation pathway, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase *FadB*. The results indicate that the preferred biosynthesis from glucose of (S)-stereoisomer of 1,3-butanediol can be ensured in

engineered *E. coli* strain due to the inversion of the fatty acid beta-oxidation pathway.

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

УДК 575.174.015.3:582.951.4

ПРИМЕНЕНИЕ SSCP АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Чижики В.К.¹, Мартынов В.В.¹, Соколова Е.А.¹, Кузнецова М.А.², Хавкин Э.Е.¹

¹ФБГНУ Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия 127550 Москва, Тимирязевская ул., 42;

e-mail: chizhikvera@bk.ru

e-mail: martynov.vik@gmail.com

²ФБГНУ Всероссийский институт фитопатологии, Большие Вяземы, Московская обл.

Методом SSCP проанализирован полиморфизм генов вирулентности возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans*. В результате получены хорошо воспроизводимые паттерны, каждый из которых соответствует определенному варианту гена и может быть использован в качестве дескриптора для различения и идентификации штаммов *P. infestans*.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, гены вирулентности, Avr гены, генотипирование, SSCP анализ

Идентификация и функциональная характеристика генов, кодирующих эффекторы *P. infestans*, относятся к наиболее интенсивно развивающимся современным областям геномики. К настоящему времени у *P. infestans* на молекулярном уровне идентифицировано 10 генов вирулентности: *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr4*, *Avr-blb1*, *Avr-blb2*, *Avr8*, *Avr9*, *Avr-vnt1* и установлены некоторые пары с соответствующими генами устойчивости. Однако механизм действия и мишени в клетках растений до сих пор остаются неизвестными. Определение профиля Avr генов может помочь различать патотипы *P. infestans* и судить об их вредоносности, а оперативный контроль состава Avr генов в посадках картофеля – помочь выбору фунгицидов и предсказывать возможные потери урожая. Поэтому актуальной задачей является поиск простых и хорошо воспроизводимых методов, позволяющих различать Avr гены при мониторинге коммерческих посадок картофеля. Одним из них является SSCP метод (single-strand conformation polymorphism), с помощью которого можно определить, являются ли фрагменты ДНК идентичными по своей нуклеотидной последовательности, не прибегая к их секвенированию. При помощи SSCP был проанализирован полиморфизм Avr генов среди монозооспоровых линий *P. infestans*, собранных с межвидовых гибридов картофеля. Результатом SSCP анализа стали паттерны, которые представляют собой набор электрофоретических зон с различной подвижностью. Для каждого гена выявлено от двух до пяти паттернов, каждый из которых характеризует определенный нуклеотидный полиморфизм гена. Все паттерны, полученные в ходе SSCP анализа, надежно воспроизводились.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-016-00144а и в рамках КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля». Секвенирование фрагментов ДНК проводили в Центре коллективного использования оборудования ВНИИСБ «Биотехнология».

UDC 575.174.015.3:582.951.4

USING SSCP ANALYSIS TO CHARACTERIZATION OF POLYMORPHISM OF VIRULENCE GENES IN PHYTOPHTHORA INFESTANS

Chizhik V.K.¹, Martynov V.V.¹, Sokolova E.A.¹, Kuznetsova M.A.², Khavkin E.E.¹

¹Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

127550 Moscow, 42 Timiryazevskaya ul.;

e-mail: chizhikvera@bk.ru

e-mail: martynov.vik@gmail.com

²Institute of Phytopathology, Bol'shiye Vyazemy, Moscow region, Russia;

The polymorphism of avirulence genes of *Phytophthora infestans*, the causative agent of potato late blight, was

evaluated by SSCP (single-strand conformation polymorphism) analysis. As a result, well-reproducible patterns were obtained. Each of this patterns corresponds to a specific variant of the gene and can be used as a descriptor for distinguishing and identifying strains of *P. infestans*.

Key words: *Phytophthora infestans*, virulence genes, Avr genes, genotyping, SSCP analysis

The search and functional evaluation of virulence genes in *P. infestans* genome is most rapidly developing area of genomics. To date, 10 virulence genes have been identified at the molecular level in *P. infestans*: *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr4*, *Avr-blb1*, *Avr-blb2*, *Avr8*, *Avr9*, *Avr-vnt1* and some pairs with the corresponding resistance genes have been identified. However, the mechanism of action and targets in plant cells are still unknown. Determining the profile of Avr genes can help to distinguish *P. infestans* pathotypes and evaluate their harmfulness, and monitoring Avr genes in potato fields can help select fungicides and predict possible yield losses. Thus, there is an urgent need in simple and well reproducible methods that allow to distinguish Avr genes when monitoring commercial planting of potatoes. One of such methods is the analysis of single-strand conformation polymorphism (SSCP method), which can be used to determine whether DNA fragments are identical in their nucleotide sequence without sequencing. Using SSCP, the Avr gene polymorphism among monozygote lines of *P. infestans* was analyzed. The result of SSCP analysis are patterns that represent a set of electrophoretic zones with different mobility. For each gene, two to five patterns were identified, each of which characterizes a particular nucleotide polymorphism of the gene. All patterns obtained during the SSCP analysis are reliably reproduced.

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 18-016-00144a) and in the framework of the Comprehensive research program «Development of potato breeding and seed production». Sequencing of DNA fragments was performed at the Center for Collective Use of Equipment "Biotechnology" at the Institute of Agricultural Biotechnology.

УДК 631.81.036

ПРЕДПОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА СЕМЯН ЯЧМЕНЯ

Кулабухов В.Ю.^{1,2}, Гарибян Ц.С.^{1,3}

¹ ФГБНУ ВНИИСБ

² Московский политехнический университет

³ РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева

127550, г Москва, ул. Тимирязевская, дом 42

e-mail: vkylabuhov@gmail.com

Показана возможность использования ультразвука для интенсификации прорастания семян ячменя сорта Скарлет.

Ключевые слова: семена, предпосевная обработка, ультразвук

Ячменный солод – незаменимый компонент в пивоваренной промышленности. При его получении важна скорость и синхронность прорастания семян ячменя. Для интенсификации прорастания семян был применен метод ультразвуковой (УЗ) обработки. Семена ячменя пивоваренного сорта Скарлет (урожай 2009 г) обрабатывали в поле низкочастотного ультразвука (частота 22 кГц) в жидких средах при различном времени воздействия (15-120 секунд). В качестве сред применены: вода, растворы гуминовых кислот и растворы стимулятора роста растений. Проращивание семян проводили на фильтровальной бумаге в чашках Петри при комнатной температуре. В качестве контрольных образцов выбрали варианты без УЗ замоченные в воде на 10 минут. Энергию прорастания определяли на третий день после обработки. По результатам экспериментальных данных наилучший результат достигнут в варианте, обработанном УЗ в течение 60 секунд в растворе гуминовых кислот с концентрацией 1 мг/л (> 90%). Полученные данные позволяют сделать вывод, что с помощью низкочастотного УЗ воздействия в растворе гуминовых кислот можно значительно ускорить процесс прорастания семян ячменя сорта Скарлет.

UDC 631.81.036

PRESOWING TREATMENT OF BARLEY SEEDS

Kulabuhov V.Yu.^{1,2}, Garibyan Ts.C.^{1,3}

¹ All-Russian research Institute of agricultural biotechnology

² Moscow Polytechnic University

³ RGAU-Moscow Agricultural Academy. K.A. Timiryazeva

127550, Moscow, st. Timiryazevskaya, 42

E-mail: vkylabuhov@gmail.com

The possibility of using ultrasound to intensify the germination of barley seeds of the Scarlet variety has been shown.

Key words: seeds, presowing treatment, ultrasound

Barley malt is an indispensable component in the brewing industry. When it is obtained, the speed and synchronicity of germination of barley seeds are important. To intensify the germination of seeds, the method of ultrasonic (US) treatment was used. Seeds of malting barley Scarlet (harvest 2009) were treated in the field of low-frequency ultrasound (frequency 22 kHz) in liquid media at different exposure times (15-120 seconds). Water, solutions of humic acids and solutions of plant growth stimulator were used as media. Seed germination was carried out on filter paper in Petri dishes at room temperature. As control samples, the variants without ultrasound soaked in water for 10 minutes were chosen. Germination energy was determined on the third day after treatment. According to the results of experimental data, the best result was achieved in the variant treated with ultrasound for 60 seconds in a solution of humic acids with a concentration of 1 mg/l (> 90%). The data obtained allows us to conclude that with the help of low-frequency ultrasonic exposure in the solution of humic acids it is possible to significantly accelerate the process of germination of seeds of barley of the Scarlet variety.

УДК 602.3:579.8

РОСТ ARTHROSPIRA PLATENSIS ПОСЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

Петрухина Д.И.

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга, Россия

248003, Калуга, ул. Степана Разина, д. 26.

e-mail: daria.petrkhina@outlook.com

В работе исследовали рост аксеничного штамма PCC 7345 цианобактерии *Arthrospira platensis* после длительного хранения при температуре минус 80 °С. Для криохранения жидкой суспензионной культуры *A. platensis* в качестве криопротектора использовали 10 %-й раствор глюкозы. Наблюдали возобновление роста *A. platensis* после хранения при минус 80 °С в течение 2 лет.

Ключевые слова: длительное хранение; цианобактерии; *Arthrospira platensis*

Лишь в ограниченном числе публикаций для изучения криоконсервации использовались виды *Arthrospira* либо *Spirulina* (конкретные исследования см. Hubalek, 2003; Motham et al., 2012; Muhling, 2000; Shiraishi, 2016; Takano et al., 1973, Taylor, Fletcher, 1998), кроме того, не многие соединения могут быть использованы в качестве криопротекторов для *Spirulina* и *Arthrospira*. В данной работе для криохранения применяли раствор глюкозы. *A. platensis* штамм PCC 7345 был заморожен в присутствии глюкозы в 10 %-ной (об./об.) концентрации. Для определения возможности восстановления жизнеспособности клеток после длительной криоконсервации, клетки *A. platensis* хранили в течение 2 лет в морозильнике при температуре минус 80 °С. В эксперименте использовали медленное охлаждение в контейнерах для криоконсервации с изопропиловым спиртом (Mr. Frosty, Nalgene), позволяющие охлаждать со скоростью примерно минус 1 °С / мин до температуры минус 80 °С при помещении в морозильник. Это пассивное замораживание широко используется для криохранения различных объектов (в том числе микроводорослей), но его применимость для сохранения штаммов *Arthrospira* и *Spirulina* не проверялась.

Используемая нами методология основана на оценке жизнеспособности по возобновлению роста клеток по время культивирования после оттаивания на агаризованной среде Заррука. Рост культуры *A. platensis* после замораживания-оттаивания (рис. 1) сравнивали с ростом контрольной культуры, не подвергавшейся замораживанию (рис. 2). Испытуемый штамм *A. platensis* PCC 7345 после хранения в течение 2 лет с 10 % -глюкозой при минус 80 °С в морозильной камере показал интенсивный рост через 32 дня после оттаивания и посева на свежую питательную среду (рис. 1). Однако после пересева на жидкую питательную среду Заррука и выращивания в колбах Эрленмейера с широким горлышком (при 30 °С в инкубаторе с постоянным перемешиванием в 110 об/мин с помощью встроенного орбитального шейкера диаметром качания 25 мм, фотопериодом в 16 часов и средней интенсивностью света 21 мкмоль·м⁻²·с⁻¹), рост восстановленной клеточной суспензии *A. platensis* не отличался от исходной культуры. Многие исследования показали, что среди видов цианобактерий штаммы *A. platensis* особенно трудны для криоконсервации (Motham et al., 2012; Muhling, 2000; Shiraishi, 2016; Takano et al., 1973). Но наши эксперименты показали, что клетки штамма *A. platensis* PCC 7345 выживали после процесса замораживания-оттаивания при условии замораживания со скоростью примерно 1 °С/мин в присутствии 10 %-глюкозы (рис. 1.).

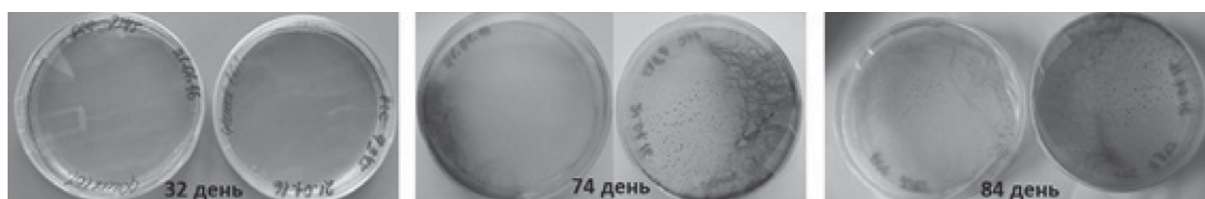


Рис. 1. Рост восстановленной культуры *A. platensis* PCC 7345 за период культивирования (две пробы)

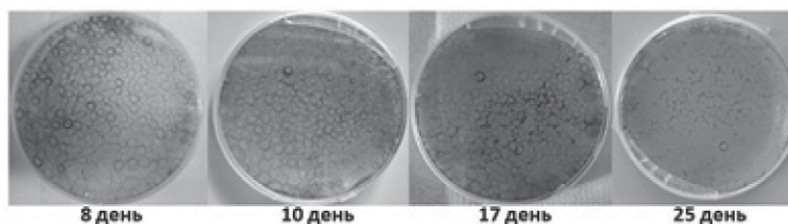


Рис. 2. Рост исходной культурой *A. platensis* PCC 7345 за период культивирования

Это первое упоминание об успешном использовании глюкозы в качестве криопротектора для сохранения штамма *A. platensis* PCC 7345 при минус 80 °С в течение 2 лет. Штамм PCC 7345 был использован для изучения криохранения, поскольку это один из штаммов рода *Arthrospira*, геном которого доступен в базе данных GenBank (номер: JN831264). В биотехнологических исследованиях часто используют варианты штамма, например мутантные. Успешное криохранение при минус 80 °С является значительным преимуществом для исходного штамма, поскольку позволяет сохранять многочисленные его варианты без дорогостоящего и трудоемкого обслуживания традиционным последовательным суб-культивированием. Таким образом, что штамм PCC 7345 потенциально подходит как модельный штамм биотехнологических и генетических исследованиях *A. platensis*. Представленные условия замораживания могут быть применены для криоконсервирования различных штаммов *Arthrospira*.

Литература:

1. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*. 2003. Vol. 46. № 3. P. 205–229.
2. Motham M., Peerapornpisal Y., Tongsriri S., Pumas Ch., Vacharapiyasophon P. High Subzero Temperature Preservation of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) and Its Ultrastructure // *Chiang Mai Journal of Science*. 2012. Vol. 39. № 4. P. 554–561.
3. Muhling M. Characterization of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains: dissertation. Durham University, 2000. 308 p.
4. Shiraishi H. Cryopreservation of the edible alkalophilic cyanobacterium *Arthrospira platensis* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2016. Vol. 80. № 10. P. 2051–2057.
5. Takano M., Sado J.I., Ogawa T., Terui G. Freezing and Freeze-Drying of *Spirulina platensis* // *Cryobiology*. 1973. Vol. 10. № 5. P. 440–444.
6. Taylor R., Fletcher R. Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies // *Journal of Applied Phycology*. 1998. Vol. 10. № 5. P. 481–501.

UDC 602.3:579.8

ARTHROSPIRA PLATENSIS GROWTH AFTER PROLONGED STORAGE

Petrukhina D.I.

Tsiolkovsky Kaluga State University, Kaluga, Russia
248003, Kaluga, Stepan Razin's street, 26.
e-mail: daria.petrukhina@outlook.com

This paper addresses growth rates of axenic strain PCC 7345 of cyanobacteria *Arthrospira platensis* after long-term preservation under minus 80 °C. 10 %-glucose solution has been used for *A. platensis* storage in liquid suspension cultures. Renewed growth of *A. platensis* culture after cryopreservation for 2 year in a minus 80 °C deep freezer has been observed.

Key words: long-term storage; cyanobacteria; *Arthrospira platensis*.

There are a limited number of studies that have used species of *Arthrospira* or *Spirulina* for investigating cryopreservation (for particular studies, refer to Hubalek, 2003; Motham et al., 2012; Muhling, 2000; Shiraishi, 2016; Takano et al., 1973; Taylor, Fletcher, 1998), and not many compounds may be used as cryoprotectants for *Spirulina* and *Arthrospira*. In this study, glucose solution has been used for storage. *A. platensis* strain PCC 7345 has been frozen in presence of 10 % concentrations (v/v) of glucose. To determine whether viable cells could be recovered after prolonged storage, *A. platensis* cells were stored in a minus 80 °C freezer for up to 2 year. Has been employed in the experiment slow cooling in isopropyl alcohol-insulated cryopreservation containers (Mr. Frosty, Nalgene) that allowed cooling at a rate of approximately minus 1 °C/min when placed in a minus 80 °C freezer. This passive freezing has been widely used in the cryopreservation of various objects (including microalgae) there are no reports on their use to cryostorage *Arthrospira* and *Spirulina* strains. The methodology used herein is based on viability recording both cell growth of post-thaw culturing on Zarrouk's agar media. The growth of frozen-and-thawed *A. platensis* culture (fig. 1) has been compared with that of the unfrozen control (fig. 2). The test strain *A. platensis* PCC 7345 preserved in 10 %-glucose for 2 year at minus 80 °C in a deep freezer and indicated of intense grow 32 days after thawing and inoculation into fresh medium (fig. 1). However, after replanting on Zarrouk's liquid nutrient medium and cultivation in Erlenmeyer flasks with wide neck (in the incubator shaker with orbital shaking motion with shaking diameter 25 mm, constant agitation of 110 rpm at 30 °C, by 16 h of light exposure followed by 8 h of darkness and the average light intensity of 21 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), grow of restored liquid suspension culture of *A. platensis* PCC 7345 did not differ from the initial culture. Many researches have suggested that, among cyanobacteria species is *Arthrospira* strains are particularly difficult to cryostorage (Motham et al., 2012; Muhling, 2000; Shiraishi, 2016; Takano et al., 1973). However, experiments with *A. platensis* PCC 7345 in this study indicated that the cells this strain survived the freezing-and-thawing process when it was frozen at a cooling rate of approximately minus 1 °C/min in the presence of 10 % glucose (fig. 1.).

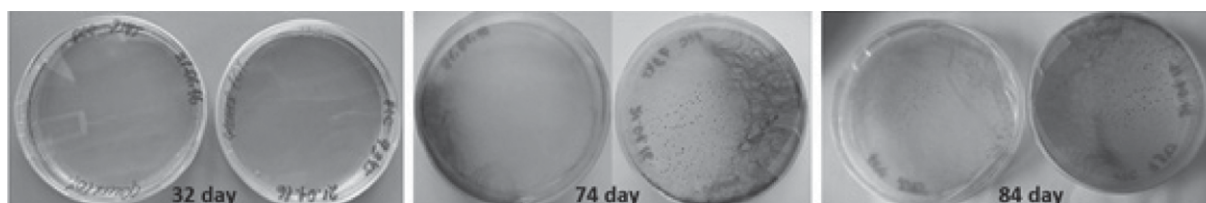


Fig. 1. Growth of restored *A. platensis* PCC 7345 culture for cultivation period (two samples)

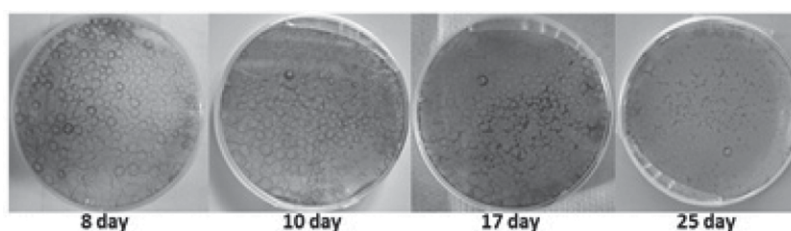


Fig. 2. Growth of initial *A. platensis* PCC 7345 culture for cultivation period

This is the first report for successful use of glucose as cryoprotectant for *A. platensis* strain PCC 7345 preservation at minus 80 °C during 2-year. Strain PCC 7345 of *A. platensis* has been employed to examine cryopreservation, because it was one of the potential models *Arthrospira* strains whose genome available in GenBank database (accession number: JN831264). To be used in biotechnical studies is often a variant number (e.g. mutants) of strain. The successful cryostorage at minus 80 °C is a significant advantage for a starting strain, because it allows the preservation of many variant strains without the expensive and time-consuming maintenance by traditional serial subculture procedure. Therefore, this study suggests that strain PCC 7345 is potentially suitable as a model strain for the biotech-genetics study of *A. platensis*. The results of the present study indicate that this freezing condition is worth pursuing when attempting to cryostorage various *Arthrospira* strains.

References:

1. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*. 2003. Vol. 46. № 3. P. 205–229.
2. Motham M., Peerapornpisal Y., Tongsriri S., Pumas Ch., Vacharapiyasophon P. High Subzero Temperature Preservation of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) and Its Ultrastructure // *Chiang Mai Journal of Science*. 2012. Vol. 39. № 4. P. 554–561.
3. Muhling M. Characterization of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains: dissertation. Durham University, 2000. 308 p.
4. Shiraishi H. Cryopreservation of the edible alkalophilic cyanobacterium *Arthrospira platensis* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2016. Vol. 80. № 10. P. 2051–2057.
5. Takano M., Sado J.I., Ogawa T., Terui G. Freezing and Freeze-Drying of *Spirulina platensis* // *Cryobiology*. 1973. Vol. 10. № 5. P. 440–444.
6. Taylor R., Fletcher R. Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies // *Journal of Applied Phycology*. 1998. Vol. 10. № 5. P. 481–501.

УДК 578.223

СБОРКА ПОЛНОГЕНОМНОЙ КОПИИ ДНК ВЫСОКОАКТИВНОГО ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА ВИРУСА СЕНДАЙ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ

Зайнутдинов С.С., Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово, Новосибирская область, Россия
e-mail: g.v.kochneva@yandex.ru

Методами генной инженерии проведена сборка полногеномной копии ДНК геномной РНК штамма Moscow вируса Сендай в плазмидной конструкции для экспрессии под контролем промотора полимеразы фага Т7. Структура кДНК скорректирована методом сайт-направленного мутагенеза в соответствии с геновариантом вируса, обладающего наибольшей онколитической активностью.

Ключевые слова: вирус Сендай, онколитическая активность, обратная генетика

Штамм Moscow вируса Сендай в силу своей безопасности и высокой онколитической активности представляет собой хорошую основу для создания противоопухолевых препаратов методами генной инженерии, а также в качестве вектора для доставки генов при генной терапии. При создании векторных систем на основе вируса Сендай необходимо обеспечить возможность его оживления из плазмидной конструкции.

Известно, что число нуклеотидов в геноме вирусов подсемейства Paramyxovirinae всегда кратно 6. Это связано с тем, что геномная РНК полностью покрыта молекулами Нбелка, одна молекула которого связывается с 6 нуклеотидами [1]. С целью соблюдения «правила шестёрки» полногеномная копия ДНК была помещена между двумя рибозимами, которые обрезают транскрибированную РНК в полном соответствии с концами генома вируса Сендай. Транскрипция осуществляется РНК-полимеразой фага Т7, промотор которой находится перед начальным рибозимом. Для усиления инициации транскрипции сразу после промотора полимеразы фага Т7 нами была введена последовательность из трёх гуаниловых нуклеотидов (GGG), после которой идёт рибозим, разрезающий образующуюся РНК непосредственно перед первым нуклеотидом генома вируса Сендай. В данном случае используется рибозим-молот (Hh rbz), который имеется у растительных виридов семейства Avsunviroidae [2]. С 3'-конца копия полного генома ограничена геномным рибозимом вируса гепатита D (HDV rbz) [3].

Для сборки плазмиды, содержащей полноразмерную копию ранее выявленного нами высокоактивного онколитического геноварианта штамма Moscow вируса Сендай (GenBank Acc. KP717417.1) [4], его последовательность была разбита на 5 участков длиной около 3000 п.н., фланкированных уникальными сайтами рестрикции. Сборку проводили в плазмиде pET15b. Концевые нетранслируемые участки генома (5'-НТО и 3'-НТО) были синтезированы химически с введением между ними полилинкера для последующей пошаговой встройки фрагментов генома. На каждом этапе сборки генома проводили секвенирование промежуточных плазмид и, при необходимости, корректировку последовательности в соответствии с целевым геновариантом штамма Moscow методом сайт-направленного мутагенеза. В результате конструирования была получена плазмида pET15b-Sen (21026 п. н.), в которой последовательно расположены: промотор полимеразы фага T7, триплет GGG, рибозим-молот, 5'-НТО, гены N, P, M, F, HN, L, 3'-НТО, рибозим вируса гепатита D, терминатор полимеразы фага T7. Эта плазмида является основой для дальнейшего конструирования рекомбинантных вариантов штамма Moscow вируса Сендай для направленной генотерапии опухолей человека за счет встройки различных трансгенов и методов обратной генетики.

Исследование поддержано РФФИ в рамках проекта № 18-34-00286 мол_а.

Литература:

1. Kolakofsky, D., Roux, L., Garcin, D. et al. Paramyxovirus mRNA editing, the «rule of six» and error catastrophe: a hypothesis. // J. Gen. Virol. – 2005. – Vol. 86. – P. 1869–1877.
2. Shannon M. Beaty, Arnold Park, Sohui T. Won, Patrick Hong, Michael Lyons, Frederic Vigant, Alexander N. Freiberg, Benjamin R. tenOever, W. Paul Duprex, Benhur Lee. Efficient and Robust Paramyxoviridae Reverse Genetic Systems. // mSphere. – 2017. – Vol. 2.
3. Nakanishi M. and Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. // Current Gene Therapy. – 2012. – Vol. 12. – P. 410–416.
4. Zainutdinov S. S., Tikunov A. Yu., Matveeva O. V., Netesov S. V., Kochneva G. V. Complete Genome Sequence of Sendai Virus Oncolytic Strain Moscow // Genome Announcements. – 2016. – Vol. 4. – No. 4. – e00818-16.

UDC 578.223

ASSEMBLING A COMPLETE GENOMIC DNA COPY OF A HIGHLY ACTIVE ONCOLYTIC VARIANT OF SENDAI VIRUS TO DESIGN A VECTOR SYSTEM FOR GENE THERAPY

Zainutdinov S.S., Tkacheva A.V., Sivolobova G.F.

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia
e-mail: g.v.kochneva@yandex.ru

Using the methods of genetic engineering, a full-length DNA copy of the genomic RNA of the Moscow strain of Sendai virus was assembled into a plasmid construct for expression under the control of bacteriophage T7 polymerase promoter. The cDNA structure was corrected by site-directed mutagenesis in accordance with genovariant of the virus showing the greatest oncolytic activity.

Key words: Sendai virus, oncolytic activity, reverse genetics

Due to its safety and high oncolytic activity, the Moscow strain of Sendai virus provides a good basis for development of antitumor preparations using genetic engineering methods, and also as a vector for gene delivery in gene therapy. When developing vector systems based on the Sendai virus, it is necessary to ensure the possibility of its recovery from the plasmid construct.

It is known that the number of nucleotides in the genome of viruses of the Paramyxovirinae subfamily is always a multiple of 6. This is due to the fact that the genomic RNA molecule is completely covered with N protein molecules, one molecule of which binds to 6 nucleotides [1]. In order to comply with the “rule of six”, a complete virus genome DNA copy was placed between two ribozymes, which cut the transcribed RNA in full accordance with the ends of the Sendai virus genome. Transcription is performed by the RNA polymerase of bacteriophage T7, the promoter of which is located before the initial ribozyme. To enhance the initiation of transcription, we introduced a sequence of three guanyl nucleotides (GGG) immediately after promoter of phage T7 polymerase; they are continued by ribozyme, cutting the resulting RNA immediately before the first nucleotide of Sendai virus genome. In this case, a hammerhead ribozyme (Hh rbz) is used, which is present in the plant viroids of the Avsunviroidae family [2]. From the 3'-end, the copy of the complete genome is limited to the genomic ribozyme of the hepatitis D virus (HDV rbz) [3].

To assemble a plasmid containing a full-length copy of the previously identified highly active oncolytic genovariant of the Moscow strain of Sendai virus (GenBank Acc. KP717417.1) [4], its genome sequence was divided into 5 fragments about 3000 bp long, flanked by unique restriction sites. The assembly was carried out in the plasmid pET15b. The terminal untranslated regions of the genome (5'-UTR and 3'-UTR) were chemically synthesized with the introduction of a polylinker sequence between them for subsequent incremental insertions of genome fragments.

At each stage of the genome assembly, sequencing of intermediate plasmids was carried out and, if necessary, their sequences were corrected by site-directed mutagenesis in accordance with the target genovariant of the Moscow strain. As a result of the construction, the plasmid pET15b-Sen (21026 bp) was obtained, in which the following structures are located: bacteriophage T7 polymerase promoter; GGG triplet; Hh rbz; 5' UTR; N, P, M, F, HN, L viral genes; 3' UTR; HDV rbz, bacteriophage T7 polymerase terminator. This plasmid is the basis for the further generation of recombinant variants of the Moscow strain of Sendai virus for directed gene therapy of human tumors due to insertion of various transgenes and methods of reverse genetics.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-00286 mol_a.

References:

1. Kolakofsky, D., Roux, L., Garcin, D. et al. Paramyxovirus mRNA editing, the «rule of six» and error catastrophe: a hypothesis. // *J. Gen. Virol.* – 2005. – Vol. 86. – P. 1869–1877.
2. Shannon M. Beaty, Arnold Park, Sohui T. Won, Patrick Hong, Michael Lyons, Frederic Vigant, Alexander N. Freiberg, Benjamin R. tenOever, W. Paul Duprex, Benhur Lee. Efficient and Robust Paramyxoviridae Reverse Genetic Systems. // *mSphere.* – 2017. – Vol. 2.
3. Nakanishi M. and Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. // *Current Gene Therapy.* – 2012. – Vol. 12. – P. 410–416.
4. Zainutdinov S. S., Tikunov A. Yu., Matveeva O. V., Netesov S. V., Kochneva G. V. Complete Genome Sequence of Sendai Virus Oncolytic Strain Moscow // *Genome Announcements.* – 2016. – Vol. 4. – No. 4. – e00818-16.

УДК 577.21:577.218:575.113:633.358

ТРАНСКРИПТОМИКА, МЕТАБОЛОМИКА И ПРОТЕОМИКА СИМБИОЗОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.): НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ В МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНОЙ СИСТЕМЕ

Жуков В.А.¹, Афонин А.М.¹, Мамонтова Т.^{2,3}, Ihling С.⁴, Соболева А.^{2,3}, Ахтемова Г.А.¹, Штарк О.Ю.¹, Жернаков А.И.¹, Кулаева О.А.¹, Клюкова М.С.¹, Грибченко Э.С.¹, Лукашева Е.², Сулима А.С.¹, Пузанский Р.К.², Шишова М.Ф.², Sinz А.⁴, Фролов А.^{2,3}, Тихонович И.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия
196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д. 3.
e-mail: vzhukov@ARRIAM.ru

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9.

³ Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Saale), Germany
06120, Halle(Saale), Weinberg 3.

⁴ Institute of Pharmacy, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Germany
06120, Halle(Saale), Wolfgang-Langenbeck-Straße 4.

Применение современных постгеномных технологий для изучения особенностей взаимодействия макро- и микросимбионтов позволяет выявлять закономерности функционирования надорганизменных растительно-микробных систем и осуществлять их направленное улучшение.

Ключевые слова: транскриптомика, протеомика, метаболомика, горох посевной, симбиотические системы

Понимание генетических механизмов, лежащих в основе функционирования симбиозов, образуемых бобовыми растениями с полезными почвенными микроорганизмами, является необходимой основой менеджмента «адаптивного» земледелия. Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является ценной сельскохозяйственной культурой во многих странах мира, включая Российскую Федерацию, а также подходящим объектом для исследования эффективности образуемых им многокомпонентных симбиозов. К настоя-

щему 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. Применение постгеномных технологий позволило продвинуться в понимании возможностей и границ применения микробных биопрепаратов для увеличения продуктивности гороха посевного.

С использованием транскриптомики был изучен синергетический эффект обработки растений гороха комбинациями микроорганизмов и продемонстрирована ускоренная реакция растений на некоторые из них. Применение газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (GC/MS) для определения состава метаболитов листьев позволило выявить «омолаживающее» влияние арбускулярной микоризы на растения гороха посевного сорта Finale: микоризованные растения дольше оставались зелеными, а метаболитный состав листьев на поздней стадии развития (56 дней) был схож с таковым у контрольных растений на более раннем сроке (21 день).

GC/MS также была применена для анализа состава протеома семян растений двух линий гороха - K-8274 и K-3358, - выращенных в условиях инокуляции комплексом микроорганизмов (клубеньковыми бактериями и грибами арбускулярной микоризы) и без инокуляции. В результате было показано, что семена линии K-8274 характеризуются более продолжительным периодом роста (и, таким образом, накапливают большую биомассу) в условиях инокуляции по сравнению с контролем, в то время как семена линии K-3358 не демонстрируют такой зависимости от инокуляции. Следовательно, различные генотипы гороха имеют разную отзывчивость на инокуляцию почвенными микроорганизмами, и для некоторых (высокоотзывчивых) генотипов целесообразно использовать микробиологические препараты, чтобы продлить фазу налива семян.

Таким образом, развитие постгеномных технологий и успешное их применение для изучения надорганизменных систем, образуемых горохом посевным, будет служить созданию новых подходов и стратегий, направленных на стабилизацию роста и развития растений в многокомпонентных растительно-микробных системах.

Работа В.А. Жукова, А.И. Жернакова и А.С. Сулимы поддержана РНФ (грант № 16-16-00118), работа А.М. Афонина, Г.А. Ахтемовой, О.Ю. Штарк, О.А. Кулаевой, М.С. Ключевой и И.А. Тихоновича была поддержана РНФ (грант № 17-76-30016).

UDC 577.21:577.218:575.113:633.358

TRANSCRIPTOMICS, METABOLOMICS AND PROTEOMICS OF SYMBIOSES OF GARDEN PEA (*PISUM SATIVUM* L.): A NEW LOOK AT PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT IN A MULTICOMPONENT PLANT-MICROBIAL SYMBIOTIC SYSTEM

Zhukov V.A.¹, Afonin A.M.¹, Mamontova T.^{2,3}, Ihling C.⁴, Soboleva A.^{2,3}, Akhtemova G.A.¹, Shtark O.Y.¹, Zhernakov A.I.¹, Kulaeva O.A.¹, Kliukova M.S.¹, Gribchenko E.S.¹, Lukasheva E.², Sulima A.S.¹, Puzanskiy R.K.², Shishova M.F.², Sinz A.⁴, Frolov A.^{2,3}, Tikhonovich I.A.^{1,2}

¹ FSBSI ARRIAM, St.Petersburg, Russia
196608, St.Petersburg, Podbelsky ch. 3.
e-mail: vzhukov@ARRIAM.ru

² Saint-Petersburg State University, St.Petersburg, Russia
199034, St.Petersburg, Universitetskaya emb. 7-9.

³Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Saale), Germany
06120, Halle(Saale), Weinberg 3.

⁴Institute of Pharmacy, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Germany
06120, Halle(Saale), Wolfgang-Langenbeck-Straße 4.

The use of modern post-genomic technologies for studying the features of the interaction of macro- and microsymbionts allows us to identify patterns of functioning of the super-organismal plant-microbial systems and to implement their directional improvement.

Key words: transcriptomics, proteomics, metabolomics, pea, symbiotic systems

Understanding the genetic mechanisms underlying the functioning of symbiosis formed by leguminous

plants with beneficial soil microorganisms is a necessary basis for the management of "sustainable" agriculture. Garden pea (*Pisum sativum* L.) is a valuable agricultural crop in many countries of the world, including the Russian Federation, as well as a suitable object for studying the effectiveness of multicomponent symbiosis. To date, using the analysis of pea transcriptomes, a number of studies have been carried out concerning differential gene expression, mapping of genes and loci of quantitative traits, analysis of intraspecific polymorphism, etc. The use of post-genomic technologies has made it possible to advance the understanding of the possibilities and limits of using microbial fertilizers to increase the productivity of pea.

Using transcriptomics, the synergistic effect combinations of microorganisms on pea plants was studied, and the accelerated response of plants to some of them was demonstrated. The use of gas chromatography - mass spectrometry (GC/MS) to determine the composition of leaf metabolites made it possible to identify the "rejuvenating" effect of arbuscular mycorrhiza on cv. Finale pea plants: mycorrhized plants remained green longer, and the metabolic composition of leaves at a late stage of development (56 days) was similar to that of control plants at an earlier date (21 days).

GC/MS was also used to analyze the composition of the proteome of plant seeds of two pea lines, K-8274 and K-3358, grown under inoculation with a complex of microorganisms (nodule bacteria and arbuscular mycorrhiza fungi) or without inoculation. As a result, it was shown that seeds of the K-8274 line were characterized by a longer growth period (and thus accumulate a greater biomass) under inoculation, as compared to the control, while the seeds of the K-3358 line didn't demonstrate such dependence on inoculation. Consequently, different pea genotypes have different responsiveness to inoculation with soil microorganisms, and for some (highly responsive) genotypes, it is advisable to use microbiological preparations in order to prolong the seed filling period.

Thus, the development of post-genomic technologies and their successful application for the study of super-organismal systems formed by pea will serve to create new approaches and strategies aimed at stabilizing the growth and development of plants in multicomponent plant-microbial systems.

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

УДК 631.52

ЭКСПРЕССИЯ И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ЭМБРИО- И ЭНДОСПЕРМОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ

Чумаков М.И., Волохина И.В., Гусев Ю.С., Гуторова О.В., Моисеева Е.М.

ФГБУ науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Саратов, Россия, 410049 Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13
e-mail: chumakovmi@gmail.com

В докладе представлены данные по применению CRISPR/Cas9 метода на кукурузе, в частности к генам, контролирующим слияние мембран гамет. Впервые дан анализ экспрессии генов, контролирующих ранние этапы эмбрио- и эндоспермогенеза у кукурузы: слияние мембран гамет, начало развития эндосперма без опыления (fie) и хроматин-моделирующие белки.

Ключевые слова: *Zea mays*; гиногенез, эмбрио-, эндоспермогенез, хроматин-моделирующие белки, гаплоиндукция, слияние мембран гамет, CRISPR/Cas9

В первой части доклада представлен анализ литературы по гаплоидии и возможных ее причинах у кукурузы за последние 70 лет, а также проверка нашей гипотезы [1] относительно связи гаплоидии со взаимодействием гамет. В геноме кукурузы впервые локализованы гены, контролирующие взаимодействие (Zm_gex2 (gamete expressed-2), 2-я хромосома), Zm_ec1 (egg cell-1), 9-я хромосома) и слияние (ZM_hap2/gsc1 (generative cell specific-1), 2-я хромосома) мембран гамет [2]. Исследована их транскрипционная экспрессия в генеративных (пыльца, семязачатки, зародышевые мешки (ЗМ)) и вегетативных (корни, листья) тканях гаплоиндуцирующей (ЗМС-П) и контрольной (ГПЛ-1) линий кукурузы. Впервые установлено, что экспрессия гена ZM_gex2 спермий-специфична у ЗМС-П и ГПЛ-1 линий кукурузы. В ЗМ и семязачатках обеих линий кукурузы экспрессия ZM_gex2 не обнаружена как до, так и после оплодотворения. В рамках проекта (AAAA-A17-117102740101-5) впервые полностью секвенирован ген ZM_gex2 (2817 н.о., линия ЗМС-П) кукурузы, консервативная часть которого (линия ГПЛ-1) аннотирована в GenBank (BankIt2052266

Seq1MG029204). У гена ZM_gex2 (ЗМС-П) выявлено 28 несовпадений с реферной линией (B73, GenBank) кукурузы, из которых 12 однонуклеотидных замен (ОНЗ), расположенные на N-конце и 5 ОНЗ на С-конце белка GEX2. Обнаружены две вставки длиной 8 нуклеотидов и 3 нуклеотида на С-конце GEX2. Впервые представляется и обсуждается 3-D модель мембранного белка HAP2 мужских гамет кукурузы, полученная по первичной аминокислотной последовательности.

Представлены литературные и собственные данные по методу геномного редактирования (CRISPR/Cas9) и его применению на кукурузе. Впервые созданы CRISPR/Cas9 вектора, содержащие гид-РНК к генам Zm_gex2 (проект № гос. рег. AAAA-A17-117102740101-5) и Zm_gsc1 (РФФИ №18-29-14048мк) кукурузы.

Во второй части доклада представлены данные собственных экспериментов по транскрипционной экспрессии генов, функционирующих на ранних этапах эмбрио- и эндоспермогенеза. В частности экспрессии генов, кодирующих хроматин-моделирующие белки (dmt102, dmt103, dmt105, hdt104, hon101, chr106) [3], и генов fie1, fie2, контролирующих начало развития эндосперма без опыления. В рамках проекта РФФИ (№18-016-00155а) впервые представлены данные по РТ-ПЦР-анализу экспрессии генов, контролирующих хроматин-моделирующие белки в завязях, ЗМ до опыления, а также в проэмбрио, зародышах и эндосперме после опыления партеногенетической (АТ-3) и контрольной (ГПЛ-1) линий кукурузы. Впервые для линии АТ-3, демонстрирующей в ряде ЗМ развитие зародыша и эндосперма без опыления (гиногенез), представлены данные количественного ПЦР-анализа транскрипционной экспрессии генов fie1, fie2, контролирующих начало эндоспермогенеза.

Работа выполнена по Программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2018–2020 гг. (№ гос. регистрации AAAA-A17-117102740101-5) и грантам РФФИ №№18-016-00155а, 18-29-14048мк.

Литература:

1. Chumakov M. I. *Matroclinic haploidy and gamete interaction in maize* // *Rus. Journal of Genetics*. 2018. Vol.54. N 10. P.1137–1141.
2. *Analyzing of the gamete-fusion genes in the haplo-inducing ZMS-P maize line* / I.V. Volokhina et al. // *Rus. J. Develop. Biol.* 2017. Vol.48. N.2. P.117–121.
3. Анализ экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК у партеногенетической кукурузы / И.В. Волохина с соавт. // *Биомика*. – 2018. – Т.10. – № 2. – С. 187-192.

UDC 631.52

EXPRESSION AND CRISPR/CAS9-EDITING OF MAIZE EMBRYO- AND ENDOSPERM DEVELOPMENT GENES

Chumakov M.I., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Gutorova O.V., Moiseeva E.M.

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, 410049 Saratov, prospect Entuziastov, 13
e-mail: chumakovmi@gmail.com*

Announcement: This report overview a data on the CRISPR/Cas9-editing method as applied to the maize, particularly to the membrane gamete fusion genes (MGFG). The expression of some genes at the early stages of maize embryo-, and endosperm development observed for the first time: fertilization-independent endosperm (fie) genes, the genes, coding the chromatin-remodeling proteins and MGFG.

Key words: Zea mays; matroclinic parthenogenesis; gynogenesis, gamete membrane fusion, chromatin-remodeling proteins, fertilization-independent endosperm (fie) genes, CRISPR/Cas9

The first part of this report presenting the literature data on the maize haploidy over the past 70 years and we tested our hypothesis [1] of the emergence of gynogenesis (parthenogenesis) in maize, in violation of the gamete membrane fusion process. The genes, controlling gamete membrane interaction (Zm_gex2 (gamete expressed-2), 2nd chromosome), Zm_ec1 (egg cell-1), 9th chromosome) and membrane fusion (ZM_hap2/gsc1 (generative cell specific-1), 2nd chromosome) genes in the maize genome was discovered in 2017 [2]. Their transcriptional expression in generative (pollen, ovaries, embryo sacs (ES)) and vegetative (roots, leaves) tissues of haploid-inducing (ZMS-P) and control (GPL-1) maize lines was investigated. For the first time was found that the ZM_gex2 gene expression is spermium-specific for ZMS-P and GPL-1 maize lines. We did not found any ZM_gex2 expression in ES and ovaries of both maize lines just before and after fertilization. Within the framework of the AAAA 17-

1171027401-5 project the ZM_gex2 (2817 n.r.) full gene sequence for ZMS-P maize line will be presented for the first time. The conservative region of the ZM_gex2 gene originated from GPL-1 line was annotated in GenBank (BankIt2052266 Seq1MG029204). The gene ZM_gex2 (ZMS-P line) revealed 28 mismatches with the reference maize line (B73, GenBank), of which 12 single-nucleotide polymorphism (SNP) located at the N-region and 5 SNP at the C-region of the GEX2 protein. Two insertions (8 and 3 nucleotides) at the GEX2 C-region were found. The 3-D model prepared from primary amino acid sequence of HAP2 gamete membrane fusogenic protein will be presented for the first time.

We also overview the genome editing (CRISPR/Cas9) method as applied to the maize. The CRISPR/Cas9 constructs, contained the g-RNA sequences to the Zm_gex2 (№ state.reg.AAAA-A17-117102740101-5 project) and Zm_gsc1 (RFBR №18-29-14048mk) maize genes was established for the first time.

In the second part of this report we present the experimental data on the transcriptional expression of the genes, involved at the early stages of the embryo- and endosperm development. In particular, genes coding chromatin-remodeling proteins (dmt102, dmt103, dmt105, hdt104, hon101, chr106) [3], as well as fie1 and fie2 (fertilization independent endosperm) genes will be discussed. Within the frame of the RFBR project (No.18-016-00155a) the RT-PCR analysis of genes expression encoding chromatin-modeling proteins in the ovaries, ES before pollination, and in pro-embryo, embryo and endosperm after pollination of parthenogenetic (AT-3) and control (GPL-1) maize lines will be presented for the first time. The RT-PCR analysis of the transcriptional expression of the fie1, fie2 genes for AT-3 line with minor spontaneous (without pollination) embryo and endosperm development will be discussed.

This work were supported in parts by the Program of fundamental scientific research of the State Academies of Sciences for 2018-2020 (№ AAAA-A17-117102740101-5) and grants from the Russian Foundation for Basic Research (№№18-016-00155a, 18-29-14048mk).

References:

1. Chumakov M. I. Matroclinic haploidy and gamete interaction in maize // *Rus. Journal of Genetics*. 2018. Vol.54. N 10. P.1137–1141.
2. Analyzing of the gamete-fusion genes in the haploid-inducing ZMS-P maize line / I.V. Volokhina et al. // *Rus. J. Develop. Biol.* 2017. Vol.48. N.2. P.117–121.
3. Analysis of the expression of DNA methylation genes at parthenogenetic maize line / I.V. Volokhina et al. // *Biomika*. 2018. Vol.10. N 2. P.187-192.

ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА - ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ

HUMAN PROTEOMICS. LOOKING INTO THE FUTURE

1. 5-ТИ МИНУТНЫЙ ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА, Иванов М.В., Бубис Ю.А., Горшков В.А., Тарасова И.А., Левицкий Л.И., Горшков М.В.	46
HUMAN PROTEOME IN MINUTES, Ivanov M.V., Bubis J.A., Gorshkov V.A., Tarasova I.A., Levitsky L.I., Gorshkov M.V.	46
2. МЕТАБОЛОМ ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ, ВЫЯВЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, Т.С.Салль, Е.В.Демьянова, Е.С.Щербак, А.В.Жахов, А.М.Ищенко, С.И.Ситкин, Т.Я.Вахитов.....	47
THE METABOLOME OF PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE, DETECTION OF BIOMARKERS AND INVESTIGATION OF THEIR REGULATORY EFFECT ON THE CELLULAR MODEL OF THE DISEASE, T.Sall, E.Demyanova, E.Shcherbakova, A.Zhakhov, A.Ischenko, S.Sitkin, T.Vakhitov	48
3. НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ У ВПЧ ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОК ПО ПРОТЕОМУ ЦЕРВИКО-ВАГИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ, Н.Л.Стародубцева	49
NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF CERVICAL DISEASE IN HPV-INFECTED PATIENTS USING CERVICOVAGINAL FLUID PROTEOME, N.Starodubtseva.....	50
4. ОБУЧЕНИЕ ГЕНЕРАТИВНЫХ ВЕРОЯТНОСТНЫХ АЛГОРИТМОВ ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ ПЕПТИДОВ НА ДАННЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ, Сулимов П.А., Кертес-Фаркаш А.	52
GENERATIVE PROBABILISTIC MODELING OF PEPTIDE-SPECTRUM MATCHING IN TANDEM MASS SPECTROMETRY, Sulimov P., Kertesz-Farkas A.....	52
5. ПРИРОДНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ РНК ФЕРМЕНТАМИ ADAR И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ НА УРОВНЕ ПРОТЕОМА ЧЕЛОВЕКА, Мошковский С.А., Кузнецова К.Г., Ключникова А.А., Гончаров А.О., Левицкий Л.И., Горшков М.Г.	53
NATIVE RNA EDITING BY ADAR ENZYMES AND ITS CONSEQUENCES ON THE LEVEL OF HUMAN PROTEOME, Moshkovskii S.A., Kuznetsova K.G., Kliuchnikova A.A., Goncharov A.O., Levitsky L.I., Gorshkov M.V.	53
6. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОНКОПРОТЕОМИКА: ЗАДАЧИ, ПРОБЛЕМЫ И РЕШЕНИЯ, Тарасова И.А., Иванов М.В., Бубис Ю.В., Соловьева Е.М., Соболева А.В., Горшков В.А., Ильина И.Ю., Мошковский С.А., Кьелдсен Ф., Чумаков П.М., Горшков М.В.	54
QUANTITATIVE CANCEROMICS: MISSIONS, CHALLENGES AND METHODS, Tarasova I.A., Ivanov M.V., Bubis Y.A., Solovieva E.M., Soboleva A.V., Gorshkov V.A., Ilina I.Y., Moshkovskii S.A., Kjeldsen F., Chumakov P.M., Gorshkov M.V.	54
7. ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТОМА ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА ПРИМЕРЕ CLOSTRIDIUM DIFFICILE, Клычников О.И., Ван Леевен Х.С., Драган И., Баккер Д., Кайпер Е.Я., Драйфхаут Я.В., Ковер Е., Хенсберген П.Я.	55
PROTEOMIC ANALYSIS OF THE PATHOGENIC BACTERIA SECRETOM ON THE EXAMPLE OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE, Klychnikov O.I., van Leeuwen H.C., Dragan I., Bakker D., Kuijper E.J., Drijfhout J.W., Cover J., Hensbergen P.J.	56
8. РАЗНООБРАЗИЕ ПРОТЕОФОРМ КАК ИСТОЧНИК СПЕЦИФИЧЕСКИХ ОНКОМАРКЕРОВ, Нарыжный С.Н., Зорина Е. С., Копылов А.Т., Клейст О.А., Белякова Н.В., Легина О.К., Ронжина Н.Л.	57
DIVERSITY OF PROTEOFORM AS A SOURCE OF SPECIFIC ONCOMARKERS, Naryzhny S.N., Zorina E.S., Kopylov A.T., Kleist O.A., Belyakova N.V., Legina O.K., Ronzhina N.L.	58
9. СОЗДАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОФИЛИРОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕПТИДОМА МОЧИ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ БЕРЕМЕННОСТИ НА БАЗЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ, Кононихин А.С., Сергеева В.А., Муминова К.Т., Стародубцева Н.Л., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Педриоли П., Захарова Н.В., Попов И.А., Ходжаева З.С., Франкевич В.Е., Аберсольд Р., Сухих Г.Т., Николаев Е.Н.	59
A TECHNOLOGY PLATFORM FOR URINE PEPTIDOME PROFILING CHANGES IN PATIENTS WITH HYPERTENSIVE PREGNANCY COMPLICATIONS ON THE BASIS OF HIGH RESOLUTION MASS-SPECTROMETRY, Kononikhin A.S., Sergeeva V.A., Muminova K.T., Starodubtseva N.L., Bugrova A.E., Indeykina M.I., Pedrioli P., Zakharova N.V., Popov I.A., Khodzhaeva Z.S., Frankevich V.E., Abersold R., Sukhikh G.T., Nikolaev E.N.	60
10. УЧАСТИЕ РОССИИ В МЕЖДУНАРОДНОМ ПРОЕКТЕ "ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА", Е.В. Ильгисонис, Е.А. Пономаренко, А.Т. Копылов, В.Г. Згода, Е.В. Поверенная, А.В. Лисица, С.Н. Нарыжный, С.П. Радько, А.И. Арчаков	61
RUSSIAN PART IN THE INTERNATIONAL HUMAN PROTEOME PROJECT, E. Ilgisonis, E. Ponomarenko, A. Kopylov, V. Zgoda, E. Poverennaya, A. Lisitsa, S. Naryzhny, S. Radko, A. Archakov	62

11. ФИЛЬТРАЦИЯ ДАННЫХ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ПОМОЩЬЮ СВЕРТОЧНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ, Кашкинов М.И., Кертеcs-Фаркаш А.	62
FILTERING OF TANDEM MASS SPECTROMETRY DATA USING CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORKS, Kashkinov M.I., Kertesz-Farkas A.	63

УДК 543.51

5-ТИ МИНУТНЫЙ ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА

Иванов М.В., Бубис Ю.А., Горшков В.А., Тарасова И.А., Левицкий Л.И., Горшков М.В.

Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе Российской академии наук, Москва, Россия

119334, Москва, Ленинский проспект, д. 38, корп. 2

e-mail: markmpt@gmail.com

Развит новый метод прямой хроматомасс-спектрометрической идентификации белков без использования фрагментации пептидов, позволяющий многократно сократить время проведения полнопротеомного анализа. Предложенный метод превосходит стандартные подходы на основе тандемной масс-спектрометрии по точности измерения относительной концентрации белков и количеству идентифицируемых белков при использовании коротких градиентов разделения.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; хроматография; протеомика.

Использование тандемной масс-спектрометрии в настоящее время является безальтернативным подходом для анализа сложных протеомов. Одной из основных проблем использования тандемной масс-спектрометрии является время, необходимое для получения спектров фрагментации от последовательно изолируемых ионов пептидов протеолитической смеси, что снижает чувствительность анализа. Нами предложен новый метод, т.н. прямой масс-спектрометрической идентификации белков без использования тандемной масс-спектрометрии, DirectMS1, на основе измерения точных масс пептидов в масс-спектрах первого уровня и предсказания их хроматографических времен удерживания. В работе было показано, что предложенный подход позволяет существенно сократить времена разделения смесей пептидов и использовать ультракороткие градиенты ВЭЖХ. Так, для 5-ти минутного градиента было идентифицировано до 600 белковых групп, а также продемонстрирована возможность полнопротеомного анализа смесей, содержащих 1 нг всех белков протеома. В то же время, подход на основе тандемной масс-спектрометрии позволяет идентифицировать менее 500 белков с пределом анализа в 10 нг всех белков протеома при тех же условиях. Кроме того было показано, что новый метод позволяет более точно оценивать относительное содержание белков в образцах.

УДК 543.51

HUMAN PROTEOME IN 5 MINUTES

Ivanov M.V., Bubis J.A., Gorshkov V.A., Tarasova I.A., Levitsky L.I., Gorshkov M.V.

Institute for energy problems of chemical physics, Russian academy of sciences, 119334 Moscow, Russia

119334, Moscow, 38 Leninsky Pr., Bld.2

e-mail: markmpt@gmail.com

A new method of direct LC-MS protein identification the use of tandem mass spectrometry was developed, which allows significant reduction of experimental analysis time. The method outperforms standard MS/MS-based proteomic approaches in terms of protein quantitation accuracy and identification efficiency for the ultra-short separation gradients.

Key words: mass-spectrometry; chromatography; proteomics

Currently, tandem mass-spectrometry (MS/MS) is the method of choice for proteome analysis. The method is based on the acquisition of the fragmentation spectra of sequentially isolated peptide ions from the proteolytic mixtures. These steps are time-consuming, thus, limiting the application of proteome analysis in large scale studies

and reducing its sensitivity. A proposed method of direct mass-spectrometry based protein identification, DirectMS1, does not employ the peptide isolation and fragmentation steps. It uses the accurate peptide mass measurements from acquired full-width peptide ion mass spectra (MS1), as well as the prediction of peptide retention times. Working in MS1-only mode of acquisition allows significant reduction on the proteome-wide analysis time by employing ultra-short HPLC gradients. In the preliminary experiment, we demonstrated the identification of up to 600 protein groups using HPLC gradients as short as 5 minutes long. Note also, that the developed DirectMS1 method was capable to successfully analyze the full proteome content using the proteolytic mixtures obtained for as low as 1 ng of all proteins of the cell lysates. On the contrary, the MS/MS-based approach was able to identify less than 500 proteins and had a protein identification limit of 10 ng of all proteins in the analyzed samples. Finally, DirectMS1 outperformed significantly the MS/MS-based approach in protein quantitation tests.

УДК: 57.085.2; 543.544, ББК: 54.135

МЕТАБОЛОМ ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ, ВЫЯВЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Т.С.Салль¹, Е.В.Демьянова¹, Е.С.Щербакова¹, А.В.Жахов¹, А.М.Ищенко¹, С.И.Ситкин¹, Т.Я.Вахитов¹

¹Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Россия, 197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7,
e-mail: t.s.sall@hpb.spb.ru

Проведено исследование по оценке метаболома сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Показана роль ряда метаболитов как потенциальных биомаркеров НАЖБП, исследовано их регуляторное действие на клеточной модели заболевания.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, метаболом, газовая хромато-масс-спектрометрия, клетки HepG2, липогенез, воспаление

НАЖБП включает в себя спектр патологических изменений печени, представленных стеатозом (избыточное накопление триглицеридов - ТГ), стеатогепатитом (развитие воспаления), фиброзом и циррозом. Актуальным является выявление биомаркеров с помощью метаболомного анализа. Выявленные метаболиты могут обладать регуляторным действием: являться этиологическими факторами, предикторами или факторами ответа организма на заболевание. Цель работы - изучение состава низкомолекулярных метаболитов сыворотки крови с помощью ГХ-МС у пациентов с НАЖБП для оценки их диагностической значимости и последующее изучение роли метаболитов в развитии стеатоза с использованием клеток HepG2.

В исследовании принимали участие пациенты со стеатозом (n=10) и стеатогепатитом (n=10) и здоровые добровольцы мужского пола (n=5). Исследования состава метаболома сыворотки крови проводились методом ГХ-МС с использованием GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu). Хроматограммы обрабатывали с помощью программ MetAlign, Alouput. Полученные данные обрабатывали с помощью разработанного авторами пакета программ BioClassifier.py, который позволял по идентифицированным метаболитам выделить группы здоровых от пациентов со стеатозом и стеатогепатитом с помощью метода PCA, а также выделить соединения, внесшие наибольший вклад в разделение групп, например, с помощью бинарного классификатора SVM. Для оценки влияния выявленных метаболитов на развитие НАЖБП создавали модель стеатоза с помощью клеток гепатокарциномы HepG2, и пальмитиновой и олеиновой кислот, чтобы смоделировать чрезмерный поток жирных кислот в гепатоциты. С помощью данной модели оценивали действие выявленных метаболитов на липогенез и воспаление (содержание провоспалительных цитокинов).

В сыворотке крови здоровых добровольцев и пациентов со стеатозом и стеатогепатитом методом ГХ-МС было идентифицировано 319 соединений. Наибольший вклад в разделение группы здоровых от пациентов со стеатозом внесли такие соединения, как гипоксантин, 3-метил-2-оксвалерановая кислота, а в разделение здоровых от пациентов со стеатогепатитом - гипоксантин, изовалериановая кислота, 4-гидроксимасляная кислота. При создании модели стеатоза добавление пальмитиновой и олеиновой кислот к клеткам HepG2 приводило к повышению уровня ТГ в 5,4 раза, содержание IL-8 увеличивалось в 2 раза. Согласно литературным данным, янтарная и пропионовая кислоты являются соответственно провоспали-

тельным и противовоспалительным метаболитами микробного происхождения; фенолкарбоновые кислоты могут служить метаболическими маркерами хронического воспаления [1]. Добавление янтарной кислоты приводило к достоверному увеличению уровня ТГ и IL-8 на 26% и 13% соответственно по сравнению с контролем (клетки с добавлением пальмитиновой и олеиновой кислот). Напротив, пропионовая кислота снижала содержание ТГ и IL-8 по сравнению с контролем. 3-фенилмолочная и 3-фенилпропионовая кислоты увеличивали содержание ТГ на 36% и 7% соответственно, и повышали уровень IL-8 на 24% и 19% соответственно по сравнению с контролем.

Литература:

1. Ситкин С. И., Вахитов Т. Я., Ткаченко Е. И. и соавт. Нарушения микробного и эндогенного метаболизма при язвенном колите и целиакии: метаболомный подход к выявлению потенциальных биомаркеров хронического воспаления в кишечнике, связанного с дисбиозом // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2017. Т. 143. № 7. С. 4 - 50.

UDC: 57.085.2; 543.544

THE METABOLOME OF PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE, DETECTION OF BIOMARKERS AND INVESTIGATION OF THEIR REGULATORY EFFECT ON THE CELLULAR MODEL OF THE DISEASE

T.Sall¹, E.Demyanova¹, E.Shcherbakova¹, A.Zhakhov¹, A.Ischenko¹, S.Sitkin¹, T.Vakhitov¹

¹State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russia, 197110, St. Petersburg, Pudozhskaya street, 7
e-mail: t.s.sall@hpb.spb.ru

This study was performed in order to evaluate serum metabolome of healthy volunteers and patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The role of a number of metabolites as potential biomarkers of NAFLD was shown and their regulatory effect was investigated in a cell model of the disease.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease, metabolome, gas chromatography-mass spectrometry, HepG2 cells, lipogenesis, inflammation

NAFLD includes a spectrum of pathological changes in the liver, represented by steatosis (excessive accumulation of triglycerides - TG), steatohepatitis (the development of inflammation), fibrosis and cirrhosis. Biomarkers identification through metabolic analysis is currently a promising task. Identified metabolites may have a regulatory effect: to be etiological factors, predictors or factors of the body's response to the disease. The purpose of this work was to study the composition of low molecular weight serum metabolites using GC-MS in patients with NAFLD in order to evaluate their diagnostic significance, as well as to study further the role of metabolites in the development of steatosis using HepG2 cells.

The study included patients with steatosis (n = 10) and steatohepatitis (n = 10) and healthy male volunteers (n = 5). The serum metabolome composition was studied by GC-MS method using GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu). The chromatograms were processed using MetAlign and Aloupput programs. The data obtained were processed using the BioClassifier.py Software package developed by the authors. This allowed the separation of healthy groups and patients with steatosis and steatohepatitis using the PCA method, as well as the identification of compounds that have made the greatest contribution to the groups separation, for example, using the SVM binary classifier. To evaluate the effect of identified metabolites on NAFLD development, hepatocellular carcinoma HepG2 cells were used to create a model of steatosis. HepG2 cells were exposed to palmitic and oleic acids to simulate an excessive flow of fatty acids into hepatocytes. This model was used to test the effect of the metabolites on lipogenesis and inflammation (proinflammatory cytokines content).

Using the GC-MS method, we identified 319 low-molecular compounds in sera of healthy volunteers and of patients with steatosis and steatohepatitis. Contribution of hypoxanthine, 3-methyl-2-oxovaleric acid was the greatest to separate healthy volunteers and patients with steatosis, while contribution of hypoxanthine, isovaleric acid, and 4-hydroxybutyric acid was the greatest to separate healthy volunteers and patients with steatohepatitis. In model of steatosis, addition of palmitic and oleic acids to HepG2 cells led to 5.4 time increase in TG level, and the content of IL-8 two-time increased. According to the literature, succinic and propionic acids are respectively pro-inflammatory and anti-inflammatory metabolites of microbial origin; phenylcarboxylic acids can be metabolic

markers of chronic inflammation [1]. Addition of succinic acid led to a significant increase in lipogenesis and inflammation: TG and IL-8 levels increased by 26% and 13% respectively compared to control (cells with addition of palmitic and oleic acids). On the contrary, propionic acid reduced the content of TG and IL-8 as compared with the control. Both 3-phenyllactic and 3-phenylpropionic acids increased the TG content by 36% and 7% respectively and of IL-8 - by 24% and 19% respectively compared to control.

References:

1. Sitkin S. I., Vakhitov T. Y., Tkachenko E. I. et al. A metabolomics approach to discover biomarkers of chronic intestinal inflammation associated with gut microbiota dysbiosis in ulcerative colitis and Celiac Disease // *Experimental and clinical gastroenterology*. 2017. V. 143. No 7. P. 4 - 50.

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ У ВПЧ ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОК ПО ПРОТЕОМУ ЦЕРВИКО-ВАГИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Н.Л.Стародубцева

ФГБУ "НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова" Минздрава России, Россия, 117198, Москва, ул. академика Опарина, 4,
e-mail: aurum19@mail.ru

Цервикальная жидкость (ЦВЖ) является ценным источником информации о физиологическом и патофизиологическом статусе женского репродуктивного тракта у женщин. Целью данного исследования является характеристика протеомного состава ЦВЖ для определения степени тяжести ВПЧ-ассоциированной интраэпителиальной неоплазии шейки матки у женщин репродуктивного возраста. Проведен полуквантитативный протеомный анализ (HPLC-MS/MS) состава ЦВЖ 73 женщин с разной стадией неопластической трансформации шейки матки (LSIL, HSIL, рак шейки матки). Показано достоверное изменение уровня 117 белков в ЦВЖ при ВПЧ-ассоциированной трансформации эпителия шейки матки. Протеомные данные были проанализированы методом дискриминантного анализа с помощью регрессии на латентные структуры (PLS-DA) для построения статистической модели, позволяющей дифференцировать тяжелую дисплазию (HSIL, CANCER) от легкой стадии/нормы (NILM и LSIL). Чувствительность модели составила 77%, а специфичность - 94%. Таким образом, протеом ЦВЖ отражает стадии злокачественного процесса в эпителии шейки матки, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией.

Ключевые слова: цервикальная жидкость, протеомика, папилломавирус человека, рак шейки матки, неоплазия, LSIL, HSIL

Раку шейки матки предшествуют интраэпителиальные неоплазии шейки матки различной степени тяжести (плоскоклеточное внутриэпителиальное поражение низкой степени, LSIL и плоскоклеточное внутриэпителиальное поражение высокой степени, HSIL). Рекомендации по скринингу патологий шейки матки варьируются от страны к стране. Но ни одно из рутинных тестов не позволяет определить риск прогрессирования неоплазии, что очень важно для молодых женщин. ЦВЖ является ценным источником информации о физиологическом и патофизиологическом статусе женского репродуктивного тракта как у небеременных, так и у беременных женщин. Целью данного исследования является характеристика протеомного состава ЦВЖ для определения степени тяжести ВПЧ-ассоциированной интраэпителиальной неоплазии шейки матки у женщин репродуктивного возраста.

Образцы ЦВЖ были получены от 73 пациенток в возрасте от 21 до 45 лет с различной формой ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки (LSIL, HSIL и РШМ) и ВПЧ-отрицательных пациенток без интраэпителиального поражения (NILM, контроль). После восстановления, алкилирования и осаждения ацетоном проводился трипсинолиз. Смесь триптических пептидов разделяли на нано-ВЭЖХ Agilent 1100 с 95-минутным градиентом от 3% до 35% ACN в воде при скорости потока 0,3 мкл/мин. Масс-спектрометрический анализ выполнялся на 7T LTQ FT Ultra (Thermo Electron, Бремен, Германия) в режиме наноспрея (положительная мода, 2,3 кВ). Затем MS файлы обрабатывались с помощью программного обеспечения MaxQuant (версия 1.1.1.2) по базе данных SwissProt.

В результате было идентифицировано 675 белков с 1% FDR. Анализ по генным онтологиям показал, что наиболее значимыми молекулярными функциями белков ЦВЖ являются каталитическая активность (36,8%) и связывание (44,4%). Большинство белков с каталитической активностью относятся к классам

гидролаз и энзимных модуляторов. Обогащение этих молекулярных процессов хорошо согласуется с предыдущими исследованиями и может доказать снижение апоптотической активности при прогрессировании дисплазии тканей. Чтобы оценить изменения в составе протеома при ВПЧ-ассоциированной неопластической трансформации шейки матки был проведен тест Уэлча с коррекцией Бонферрони (значение $p < 0,01$). В результате 117 белков показали значительные изменения в составе ЦВЖ по сравнению с группой NILM. Более того, степень изменения уровня данных белков в ЦВЖ увеличивается с повышением степени тяжести злокачественной трансформации.

Протеомные данные были проанализированы с использованием дискриминантного анализа с проекцией на латентные структуры (PLS-DA) для построения статистической модели, позволяющей дифференцировать тяжелую дисплазию (HSIL, PШМ) от легкой стадии/нормы (NILM и LSIL). Этот неинвазивный диагностический подход особенно важен с клинической точки зрения, поскольку он определяет тактику ведения пациенток. В случае тяжелой дисплазии (HSIL, PШМ) требуется хирургическое вмешательство, при LSIL целесообразны периодические повторные обследования. Это имеет особое значение для женщин репродуктивного возраста. Для обучения математической модели PLS-DA были использованы протеомные данные 40 образцов (обучающая выборка). Переменная Y была установлена равной 1 для образцов с тяжелой дисплазией (HSIL, PШМ) и 0 для легкой стадии/нормы (NILM и LSIL). Продемонстрирована превосходную способность протеома ЦВЖ к дифференциации легкой/тяжелой неоплазии шейки матки ($R^2 = 0,95$, $Q^2 = 0,88$). ROC-анализ разработанной PLS-DA модели, проведенный на обучающей (валидирующей – 33 образца) выборках, показал 100% (77%) чувствительность и 100% (94%) специфичность при пороге 0,55 (0,48), с AUC, равным 1,0 (0,87).

Дополнительно, была определена концентрация одного из предлагаемых маркеров, альфа-актина-4 (ACTN4), методом ELISA. Статистически значимые различия были получены для всех групп, за исключением пары NILM - LSIL. Эти данные подтверждают высокий диагностический потенциал ACTN4 для уточнения стадии трансформации эпителия шейки матки и указывают на возможно высокий потенциал других белков в качестве биомаркеров.

Проведен ВЭЖХ-МС/МС анализ протеомного состава ЦВЖ 73 женщин репродуктивного возраста с ВПЧ-ассоциированными интраэпителиальными неоплазиями шейки матки. В результате 117 белков показали значительные изменения в составе ЦВЖ по сравнению с группой NILM. Более того, степень изменения уровня данных белков в ЦВЖ увеличивается с повышением степени тяжести злокачественной трансформации. Разработанная PLS-DA модель для дифференциации легкой/тяжелой неоплазии шейки матки ($R^2 = 0,95$, $Q^2 = 0,88$) показала 77% чувствительность и 94% специфичность при пороге 0,48, с AUC равным 0,87, на новой (валидирующей) выборке из 33 образцов. Подтвержден методом ELISA высокий диагностический потенциал белка ACTN4 для уточнения стадии трансформации эпителия шейки матки. Таким образом, протеом ЦВЖ отражает стадии злокачественного процесса в эпителии шейки матки, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией.

Данное исследование было выполнено в рамках гранта РНФ № 18-75-10097.

NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF CERVICAL DISEASE IN HPV-INFECTED PATIENTS USING CERVICOVAGINAL FLUID PROTEOME

N.Starodubtseva

V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Russia, 117198, Moscow, Oparina str., 4
e-mail: aurum19@mail.ru

Cervicovaginal fluid (CVF) is a valuable source of clinical information about the physiological and pathophysiological status of the female reproductive tract in women. The aim of this study is to characterize the proteomic composition of CVF in order to assess the severity of HPV-associated intraepithelial neoplasia of the cervix among women of reproductive age. The proteomic composition of CVF from 73 women of reproductive age at different stages of cervix neoplastic transformation (LSIL, HSIL, CANCER) were investigated. Label-free quantitation approach based on HPLC-MS/MS method furthered by statistical data analysis allowed us to find 117 significant changed proteins. A validation step on the additional set of samples was performed. CVF proteomic data from the discovery stage (40 samples) was analyzed by the PLS-DA method to build a statistical model, allowing to differentiate severe dysplasia (HSIL, CANCER) from the mild/normal stage (NILM and LSIL) and ROC AUCs were obtained on the independent set of 33 samples. The sensitivity of the model was 77% and the specificity - 94%. CVF proteome proved to be reflect the stage of cervical epithelium neoplastic process.

Key words: cervicovaginal fluid, proteomics, human papillomaviruses, cervical cancer, LSIL, HSIL

Cervical cancer is preceded by cervical intraepithelial neoplasia of different degrees of severity (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL and high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL). Screening guidelines for cervix pathologies vary from country to country. Even invasive histological examination of cervical biopsy is limited to tissues structure analysis. None of the routine tests allow to determine the risk of neoplasia progression which is very important for young women. CVF is a valuable source of clinical information about the physiological and pathophysiological status of the female reproductive tract in both non-pregnant and pregnant women ¹¹. The aim of this study was to characterize the proteomic composition of CVF in order to assess the severity of HPV-associated intraepithelial neoplasia of the cervix among women of reproductive age.

CVF samples were obtained from 73 patients from 21 to 45 years who had various forms of HPV-associated cervical lesions (LSIL, HSIL and cancer) and HPV-negative patients with no intraepithelial lesion or malignancy (NILM). CVF proteins were reduced; alkylated, precipitated in acetone with TFA and digested with trypsin. Tryptic peptide mixtures were separated on a nano-HPLC Agilent 1100 system using a self-packed capillary column by a 95-min gradient from 3% to 35% of ACN in water at a flow rate of 0,3 mkl/min. Mass-spectrometry analysis was carried out on a 7T LTQ FT Ultra (Thermo Electron, Bremen, Germany) instrument using a nanospray ion source (positive ion mode, 2.3 kV). Raw MS files were processed with MaxQuant software (version 1.1.1.2) against the SwissProt database. For protein identification and label-free quantification MaxQuant software (version 1.1.1.2) against the SwissProt database was used.

A total of 675 proteins were identified with 1% FDR. Most significant molecular functions were catalytic activity (36,8%) and binding (44,4%). Most of the proteins with catalytic activity belong to hydrolases and enzyme modulator classes. Enrichment of these molecular processes is in good agreement with previous studies and may prove the decrease in the apoptotic activity during tissues dysplasia progression.

The CVF proteome proved to reflect the stage of cervical epithelium neoplastic process. Moreover, the degree of change increased with the severity of the malignant transformation. To assess the changes in the proteome composition in HPV associated the neoplastic transformation of the cervix Welch's t-test with Bonferroni correction (p -value<0.01) was performed. As a result 117 proteins showed significant changes in CVF composition compared to the NILM group.

The obtained CVF proteomic data was analyzed using the PLS-DA method to build a statistical model, allowing to differentiate severe dysplasia (HSIL, CANCER) from the mild/normal stage (NILM and LSIL). This non-invasive diagnostic approach is particularly important from a clinical point of view as it determines the treatment of patients. In a case of severe dysplasia (HSIL, CANCER) surgery is required, for LSIL periodically repeated examinations are more appropriate. This is of especial importance for women of reproductive age. A development set of 40 samples was used for PLS-DA model training. The Y variable was set to 1 for samples with severe dysplasia (HSIL, CANCER) and to 0 for the mild/normal stage (NILM and LSIL). The proteomic composition of CVF demonstrated an excellent ability for mild/severe cervical neoplasia differentiation ($R^2=0.95$, $Q^2=0.88$). ROC analysis of the PLS-DA model built on the development (validation) set of samples resulted in 100% (77%) sensitivity and 100% (94%) specificity at 0.55 (0.48) threshold, with AUC equal to 1.0 (0.87).

In addition, ELISA was performed to verify the differential profiles of alpha-actinin-4 (ACTN4). Statistically significant differences were obtained for all groups, except NILM vs LSIL. This data confirms high diagnostic potential of ACTN4 for cervical epithelium transformation stage determination and indicates the possibly high potential of other picked out proteins to work as biomarkers.

The proteomic composition of CVF from 73 women of reproductive age at different stages of cervix neoplastic transformation (LSIL, HSIL, CANCER) were investigated. Label-free quantitation approach based on LC-MS/MS method furthered by statistical data analysis allowed us to find 117 significant changed proteins. CVF proteomic data from the discovery stage was analyzed by the PLS-DA method to build a statistical model, allowing to differentiate severe dysplasia (HSIL, CANCER) from the mild/normal stage (NILM and LSIL) and ROC AUCs were obtained on the independent set of samples. The sensitivity of the model was 77% and the specificity - 94% (AUC 0.87, threshold 0.48). CVF proteome proved to be reflect the stage of cervical epithelium neoplastic process.

This work was supported by the Russian Science Foundation project no. 18-75-10097.

УДК 57.081

ОБУЧЕНИЕ ГЕНЕРАТИВНЫХ ВЕРОЯТНОСТНЫХ АЛГОРИТМОВ ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ ПЕПТИДОВ НА ДАННЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Сулимов П.А., Кертес-Фаркаш А.

Департамент анализа данных и искусственного интеллекта, Факультет компьютерных наук, Национальный исследовательский университет "Высшая Школа Экономики"
125319, Москва, Кочновский проезд, 3
e-mail: sulpav@yandex.ru

Современные подходы к идентификации спектров основаны на поиске в базах данных, в которых экспериментальные спектры итеративно сравниваются с большим набором теоретических спектров. Сравнение обычно выполняется с использованием функций подобия, таких как hyperscore в X!Tandem, или XCORR в Sequest, Tide и Comet. Эти функции сходства, по существу, основаны на скалярном произведении векторного представления экспериментального и теоретического спектров и обеспечивают ограниченное понимание природы фрагментации пептидных молекул.

Ключевые слова: биоинформатика, протеом человека, распознавание пептидов, тандемная масс-спектрометрия

В этом докладе я представляю новый подход, в котором сопоставление экспериментального спектра $\mathbf{v}$ теоретическому спектру $\mathbf{h}$ моделируется при помощи ограниченной машины Больцмана, передаваемой в виде $P(\mathbf{v}, \mathbf{h}) = \frac{1}{Z} \exp - E(\mathbf{v}, \mathbf{h})$, где $E(\mathbf{v}, \mathbf{h}) = -\mathbf{v}^T \mathbf{W} \mathbf{h}$ это функция энергии, Z - нормализация, а $\mathbf{v}$ и $\mathbf{h}$ являются векторными представлениями спектров. Логарифм функции правдоподобия может быть записан в следующем виде $\log P(\mathbf{v}, \mathbf{h}) = \mathbf{v}^T \mathbf{W} \mathbf{h} - \log (Z)$. Эта формула очень похожа на функцию скоринга XCORR, и фактически наша формула может рассматриваться как естественное обобщение XCORR, для которой веса модели обучаются на основе экспериментальных данных. Этот подход поможет экспериментальным биологам пролить свет на основные механизмы фрагментации пептидов.

UDC 57.081

GENERATIVE PROBABILISTIC MODELING OF PEPTIDE-SPECTRUM MATCHING IN TANDEM MASS SPECTROMETRY

Sulimov P., Kertesz-Farkas A.

Department of Data Analysis and Artificial Intelligence, Faculty of Computer Science,
National Research University Higher School of Economics, Russian Federation
125319, Moscow, Kochnovskiy Proezd, 3
e-mail: sulpav@yandex.ru

Current approaches on spectra identification are based on database searching approaches in which spectra are iteratively compared against a large collection of theoretical spectra. The comparison is usually carried out by using similarity functions such as hyperscore in X!Tandem, or XCORR in Sequest, Tide, and Comet. These similarity functions are essentially based on the scalar product of the vector representation of the experimental and the theoretical spectra and provide a limited insight to the nature of the fragmentation of peptide molecules

Key words: Bioinformatics, Human Proteome, Peptide Identification, Tandem Mass-Spectrometry Data Analysis

In this talk, I will introduce a new approach in which the matching of an experimental spectrum $\mathbf{v}$ to a theoretical spectrum $\mathbf{h}$ is modeled by Restricted Boltzmann Machines (RBMs) defined as follows $P(\mathbf{v}, \mathbf{h}) = \frac{1}{Z} \exp - E(\mathbf{v}, \mathbf{h})$, where $E(\mathbf{v}, \mathbf{h}) = -\mathbf{v}^T \mathbf{W} \mathbf{h}$ is the energy function, Z is the normalization factor, and $\mathbf{v}$ and $\mathbf{h}$ are vector representations of spectra. The log-likelihood of a data can be rewritten as $\log P(\mathbf{v}, \mathbf{h}) = \mathbf{v}^T \mathbf{W} \mathbf{h} - \log (Z)$. This formula extremely resembles to the XCORR scoring function, and in fact, our formula can be considered as a natural generalization of the XCORR, where the model weights are trained from the experimental data. This approach will help for experimental biologists shed a light on the underlying mechanisms of peptide fragmentation.

УДК 577.7

ПРИРОДНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ РНК ФЕРМЕНТАМИ ADAR И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ НА УРОВНЕ ПРОТЕОМА ЧЕЛОВЕКА

Мошковский С.А., Кузнецова К.Г., Ключникова А.А., Гончаров А.О., Левицкий Л.И., Горшков М.Г.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10
email: smosh@mail.ru

Впервые на уровне протеома человека и модельных животных идентифицированы участки природного редактирования РНК ферментами ADAR.

Ключевые слова: протеом человека; редактирование РНК; ADAR; панорамная протеомика; протеоформа.

После более или менее успешного решения задачи анализа белков как генных продуктов протеомика человека столкнулась с проблемой идентификации и анализа белковых вариантов и модификаций, объединяемых термином «протеоформы». Одной из причин разнообразия последовательностей белков являются изменяющие рибосомный код посттранскрипционные модификации РНК, основным из которых считается редактирование РНК ферментами семейства РНК-зависимых аденозиндеаминаз (ADAR). Мы использовали доступные сведения о кодирующих аминокислотные замены участках редактирования ферментами ADAR у человека и модельных организмах, включая плодную мушку и мышь, чтобы впервые идентифицировать такие замены на белковом уровне в панорамных протеомах центральной нервной системы. Как и ожидалось, у беспозвоночного было найдено порядка 70 участков редактирования более чем в 50 белках, тогда как у млекопитающих число таких сайтов не превышало 15. В соответствии с имеющимися работами, в мозге человека редактируются преимущественно субъединицы ионных каналов глутаматных рецепторов, а также компоненты внутриклеточных пресинаптических комплексов. Полученные нами пилотные данные обеспечат возможность анализа последствий редактирования РНК в различных патологиях человека.

UDC 577.7

NATIVE RNA EDITING BY ADAR ENZYMES AND ITS CONSEQUENCES ON THE LEVEL OF HUMAN PROTEOME

Moshkovskii S.A., Kuznetsova K.G., Kliuchnikova A.A., Goncharov A.O., Levitsky L.I., Gorshkov M.V.

Institute of Biomedical Chemistry
10 Pogodinskaya, Moscow, 119121 Russia
e-mail: smosh@mail.ru

Sites of the native RNA editing by ADAR enzymes were identified for the first time at the proteome level for human and model animals.

Key words: human proteome; RNA editing; ADAR; shotgun proteomics; proteoform.

After relative success of analysis of proteins as gene products, human proteomics has encountered a challenge of identification and analysis of protein variants and modifications known under the name of proteoforms. One source of proteoform variety is a post transcriptional RNA modification some types of which change a ribosomal code. Most recognised of them is RNA editing by adenosine deaminases, RNA dependent (ADAR). We used available data on amino acid substitution-encoding ADAR RNA editing sites in human and model organisms, such as mouse and fruit fly, in order to identify those substitutions at the protein levels in shotgun proteome data of central nervous systems. As expected, insect proteomes yielded about 70 these sites in more than 50 proteins, as in mammals the number of them did not exceed 15. According to background works, glutamate receptor ion channel subunits and components of presynaptic intracellular complexes were edited in the human brain. Our pilot data provide an option to analyse consequences of RNA editing in proteomes of various disease conditions.

УДК 616-006, 543.51

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОНКОПРОТЕОМИКА: ЗАДАЧИ, ПРОБЛЕМЫ И РЕШЕНИЯ

Тарасова И.А., Иванов М.В., Бубис Ю.В., Соловьева Е.М., Соболева А.В., Горшков В.А., Ильина И.Ю., Мошковский С.А., Кьелдсен Ф., Чумаков П.М., Горшков М.В.

Институт энергетических проблем химической физики РАН им. В.Л.Тальрозе, Москва, Россия
119334, Москва, Ленинский пр, д. 38, корп. 2
e-mail: atarasova@yandex.ru

На примере модели мультиформной глиобластомы представлены методики определения отклика клеток на обработку или стресс по количественным изменениям протеома. Обсуждаются факторы, искажающие результаты количественного анализа, и способы компенсации этих негативных эффектов. Рассмотрены вопросы интерпретации полученных количественных данных и генерации гипотез на их основе.

Ключевые слова: количественная протеомика, онкопротеомика; глиобластома; интерфероновый сигналинг; сигнальные пути.

В биологии и медицине тестирование клеточных моделей на чувствительность к препарату или стрессу является стандартным методом исследования влияния выбранного воздействия на жизнеспособность клеток. Такой эксперимент дает возможность выявить последствия различных модификаций или дефектов, намеренно внесенных или изначально присутствующих в клетках. Охарактеризовать механизмы, т.е. как клетки пришли в то, или иное состояние, позволяют подходы на основе «омиксных» технологий, количественно описывающие эти дефекты на молекулярном уровне. В данной работе рассмотрены некоторые подходы к анализу количественных изменений в протеоме клеток, обсуждаются достоинства и ограничения безметочных методов протеомного профилирования, в том числе проблема детектирования низкоконцентрационных белков, известная как «проблема исчезнувших белков» ("missing values"). Рассмотрены некоторые аспекты статистического анализа протеомных данных, в частности, вопросы корректного планирования протеомного исследования. На примере клеточных культур мультиформной глиобластомы продемонстрированы отличия в количественных профилях клеточных протеомов в ответ на обработку интерферонами I типа и предложены гипотезы, интерпретирующие эти различия.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грант № 18-29-01059.

UDC 616-006, 543.51

QUANTITATIVE CANCEROMICS: MISSIONS, CHALLENGES AND METHODS.

Tarasova I.A., Ivanov M.V., Bubis Y.A., Solovieva E.M., Soboleva A.V., Gorshkov V.A., Ilina I.Y., Moshkovskii S.A., Kjeldsen F., Chumakov P.M., Gorshkov M.V.

Talrose Institute for energy problems of chemical physics RAS, Moscow, Russia
38 Leninsky prospekt, bld.2, 119334 Moscow
e-mail: atarasova@yandex.ru

Workflows based on large scale proteome profiling for determination of cellular responses to treatment or stress are presented. Factors negatively affecting the results of quantitative analyses, and approaches to eliminating those effects are discussed. Puzzles in quantitative data interpretation and generation of data-driven hypotheses are considered.

Key words: comparative proteomics, canceromics; glioblastoma; interferon signaling; signaling pathways.

Testing the cell cultures for sensitivity to treatment or stress is the method-of-choice in biology and medicine for studying treatment effects on cell viability. Such bioassays allow rapidly to assess the effects of modifications or defects intentionally introduced or naturally present in the cells. Uncovering the mechanisms that drive cells to a particular outcome is one of the objectives of "omics" science which enables quantitative description of molecular alterations. In this work, approaches to quantitative analysis of cell proteome changes were considered. The

differences in quantitative proteome profiles between the type I IFN treated and untreated glioblastoma primary cultures were demonstrated. Advantages and pitfalls of label free quantification including the so called "missing value" problem will be discussed. Some aspects of statistical analysis of proteomics data, such as the correctness of study designing will be reviewed. And finally, the hypotheses interpreting observed proteome differences were suggested.

This study was supported by Russian Foundation for Basic Research, № 18-29-01059.

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТОМА ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА ПРИМЕРЕ CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Клычников О.И., Ван Леевен Х.С., Драган И., Баккер Д., Кайпер Е.Я., Драйфхаут Я.В., Ковер Е., Хенсберген П.Я.

Кафедра биохимии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: oklych@yahoo.co.uk

Проведён протеомный анализ секретомата патогена *Clostridium difficile* из кондиционной среды. Установлено, что продукт гена *cd2830* является активной протеазой с уникальной способностью к расщеплению Pro-Pro связей. Найден белок-мишень этой Pro-Pro эндопротеазы – PPEP-1 – коллаген-связывающий белок CD2831. Показана роль PPEP-1 при переходе бактерии с адгезивной в планктонную форму. Предложена ключевая роль PPEP-1 в диссеминации патогена.

Ключевые слова: протеомика, секретом, *Clostridium*, металлопротеаза, PPEP-1

Секретируемые белки бактерий представляют собой биологически важное подмножество белков, участвующих в ключевых процессах, связанных с инфекцией. Они являются факторами токсичности, участвуют в адгезии, колонизации и диссеминации. В данной работе мы проанализировали белки кондиционной культуральной среды *Clostridium difficile* методом белкового СДС-ПААГ, их последующего трипсинолиза в геле и дальнейшем разделении и идентификации полученных пептидов на обратнофазной колонке методом ВЭЖХ-тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS, amaZon Speed ETD, Bruker) (Hensbergen et al., 2014). В результате протеомного эксперимента нами было идентифицировано 118 белков. Дальнейшая фильтрация данных и биоинформатический анализ показали, что гипотетический белок CD2830 может быть новой секретируемой металлопротеазой. Инкубирование очищенного препарата белка CD2830 с тотальным клеточным лизатом культуры эпителиальных клеток человеческой аденокарциномы (Caco-2) показало, что данный гипотетический фермент действительно может специфически расщеплять белок HSP90 β . Нам также удалось установить сайт расщепления – KAAEEPNA¹AVPDEIK. Для установления аминокислотной специфичности нами был произведён синтез всех возможных аминокислотных замен в позициях P3-P3' вокруг сайта расщепления этого пептида. Анализ 115 пептидов, инкубированных с белком, показал, что сайтом расщепления данной протеазы могут являться комбинации, содержащие пролин (Pro, P) в позиции P1', а также Pro-Pro в сайте расщепления: P3(X) P2(X) P1(A|P) P1'(A|P) P2'(V|I|L) P3'(P). Эта специфичность является уникальной среди всех описанных ранее эндопротеаз. Нами было установлено, что в протеоме *C. difficile* были найдены две потенциальные молекулы адгезии, CD2831 и CD3246, которые содержат несколько Pro-богатых сайтов – потенциальных мишеней CD2830 (всего 13). Впоследствии мы обнаружили, что CD2830 эффективно расщепляет CD2831 по всем предсказанным Pro-Pro сайтам расщепления. Более того, мы показали, что нативный, секретируемый бактериальными клетками, CD2830 расщепляет эндогенные CD2831 и CD3246 в клеточной культуре. Нокауты *C. difficile* по гену *cd2830* показали их пониженную адгезивность при росте на коллагеновом матриксе, а также пониженную вирулентность в опыте с заражением мышей спорами патогена (Hensbergen et al., 2015). Эти данные подчёркивают, что CD2830 является высокоспецифичной эндопротеиназой с предпочтением к остаткам пролина. Более того, эффективное расщепление двух предполагаемых белков поверхностной адгезии указывает на возможную роль CD2830 в регуляции адгезии *C. difficile*.

Литература:

1. Hensbergen, P.J., Klychnikov, O.I., Bakker, D., van Winden, V.J.C., Ras, N., Kemp, A.C., Cordfunke, R.A., Dragan, I., Deelder, A.M., Kuijper, E.J., Corver J., Drijfhout J.W., and van Leeuwen H.C. (2014). A novel secreted metalloprotease

(CD2830) from *Clostridium difficile* cleaves specific proline sequences in LPXTG cell surface proteins. // *Molecular & cellular proteomics: MCP* 13, 1231-1244. <http://www.mcponline.org/content/13/5/1231>
2. Hensbergen, P.J., Klychnikov, O.I., Bakker, D., Dragan, I., Kelly, M.L., Minton, N.P., Corver, J., Kuijper, E.J., Drijfhout, J.W., and van Leeuwen, H.C. (2015). *Clostridium difficile* secreted Pro-Pro endopeptidase PPEP-1 (ZMP1/CD2830) modulates adhesion through cleavage of the collagen binding protein CD2831. // *FEBS letters* 589, 3952-3958. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579315009515>

PROTEOMIC ANALYSIS OF THE PATHOGENIC BACTERIA SECRETOM ON THE EXAMPLE OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Klychnikov O.I., van Leeuwen H.C., Dragan I., Bakker D., Kuijper E.J., Drijfhout J.W., Cover J., Hensbergen P.J.

Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119234, Russia, Moscow, Leninskie Gory, 1, bld. 12
e-mail: oklych@yahoo.co.uk

A proteomic analysis of the *Clostridium difficile* secretome from the pathogen conditioned medium was performed. We have found that the cd2830 gene product is an active protease with a unique cleavage ability to cleave Pro-Pro bonds. We also found the target protein of this Pro-Pro endoprotease - PPEP-1 - collagen-binding protein CD2831. The role of PPEP-1 in the transition of bacteria from adhesive to motile form is shown. The key role of PPEP-1 in pathogen dissemination is proposed.

Key words: proteomics, secretome, *Clostridium*, metalloprotease, PPEP-1

Bacterial secreted proteins are the biologically important subset proteins involved in infection-related processes. They are factors toxicity, involved in adhesion, colonization and dissemination. In this work, we analysed the proteins of *Clostridium difficile* conditioned culture medium using the protein SDS-PAGE method, subsequent *in gel* trypsin digestion, followed by the peptides separation on a reverse phase column using the HPLC-coupled tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, amaZon Speed ETD, Bruker) (Hensbergen et al., 2014.). As a result of the proteomic experiment, we have identified 118 proteins. Further data filtering and bioinformatics analysis showed that the hypothetical protein CD2830 might be a new secreted metalloprotease. Incubating the purified CD2830 protein with the total lysate of cultured human adenocarcinoma epithelial cells (Caco-2) showed that this hypothetical enzyme can indeed specifically cleave the HSP90 β protein. We were also able to identify a cleavage site - KAAEPPNA ↓ AVPDEIK. To pinpoint preferences around P3-P3' positions of the cleavage site for this peptide, we have synthesized all possible amino acid residue permutations. Analysis of 115 peptides incubated with the purified protein showed that the protease can cleave such combinations including proline (Pro, P) in the position P1', as well as Pro-Pro bond in a cleavage site: P3(X) P2(X) P1(A|P) ↓ P1'(A|P) P2'(V|P|I) P3'(P). This specificity is unique among all the endoproteases has been previously described. We have proposed that in the *C. difficile* proteome there were two potential adhesion molecules, CD2831 and CD3246, which contain several Pro-rich sites – potential targets of CD2830 (13 in total). In our experiments, we have shown that CD2830 effectively cleaves CD2831 across all Pro-Pro predicted cleavage sites. Moreover, we have found that native, secreted by the bacteria, CD2830 cleaves endogenous CD2831 and CD3246 in cell culture. The *C. difficile* knockouts for the cd2830 gene showed reduced adhesiveness of bacteria during growth on the collagen matrix, as well as reduced virulence in experiments with infection of mice with the pathogen spores (Hensbergen et al., 2015). These data highlight that CD2830 is a highly specific endoproteinase with preferences for proline residues. Moreover, effective cleavage of two putative surface adhesion proteins indicates a possible role for CD2830 in regulating adhesion of *C. difficile*.

References:

1. Hensbergen, P.J., Klychnikov, O.I., Bakker, D., van Winden, V.J.C., Ras, N., Kemp, A.C., Cordfunke, R.A., Dragan, I., Deelder, A.M., Kuijper, E.J., Corver, J., Drijfhout J.W., and van Leeuwen H.C. (2014). A novel secreted metalloprotease (CD2830) from *Clostridium difficile* cleaves specific proline sequences in LPXTG cell surface proteins. // *Molecular & cellular proteomics: MCP* 13, 1231-1244. <http://www.mcponline.org/content/13/5/1231>
2. Hensbergen, P.J., Klychnikov, O.I., Bakker, D., Dragan, I., Kelly, M.L., Minton, N.P., Corver, J., Kuijper, E.J., Drijfhout, J.W., and van Leeuwen, H.C. (2015). *Clostridium difficile* secreted Pro-Pro endopeptidase PPEP-1 (ZMP1/CD2830) modulates adhesion through cleavage of the collagen binding protein CD2831. // *FEBS letters* 589, 3952-3958. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579315009515>

УДК 577.112.083

РАЗНООБРАЗИЕ ПРОТЕОФОРМ КАК ИСТОЧНИК СПЕЦИФИЧЕСКИХ ОНКОМАРКЕРОВ

Нарыжный С.Н.^{1,2}, Зорина Е.С.¹, Копылов А.Т.¹, Клейст О.А.², Белякова Н.В.², Легина О.К.², Ронжина Н.Л.²

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, Москва, 119121, Россия

²Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, 188300, Россия

e-mail: snaryzhny@mail.ru

На основании проведенного сравнительного анализа профилей протеоформ нормальных и раковых клеток предварительно обозначены потенциальные специфические онкомаркеры глиобластомы и гепатокарциномы.

Ключевые слова: протеоформа; онкомаркер

Анализ на онкомаркеры, том числе и белковые, является одним из важных этапов в диагностике и лечении онкологических заболеваний. В настоящее время применяется множество тестов, основанных на их определении. Однако все эти тесты могут давать как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Поэтому идеально специфические маркеры, детектируемые только при заболевании, всегда являлись заветной целью онкологов. Обнаружение и внедрение таких биомаркеров позволит сделать большой шаг к персонализированной медицине, улучшению диагностики и эффективности лечения онкологических заболеваний. Протеомика в последнее время достигла определенного прогресса в выявлении белкового многообразия (протеолиз, процессинг, сплайсинг, пост-трансляционные модификации...), выражаемого в наличии у каждого белка различных форм – протеоформ. Это многообразие динамично и в случае онкологии возрастает многократно по причине раковой гетерогенности. В наших исследованиях при анализе нормальных и раковых клеток мы применяем электрофоретические способы разделения протеоформ (двумерный электрофорез, изоэлектрофокусирование и полу-виртуальный двумерный электрофорез) с последующим детектированием жидкостной хромато масс-спектрометрией (ESI – LC MS/MS). В настоящее время нами накоплен достаточно большой объем данных, детальный анализ которых позволил наметить потенциальные специфические онкомаркеры глиобластомы и гепатокарциномы. Среди них присутствуют протеоформы не только тех белков, которые уже находятся в списке онкомаркеров, но и некоторых других.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. Масс-спектрометрические работы выполнены на приборной базе ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ им. В.Н. Ореховича (Москва), который поддерживается Министерством образования и науки РФ (соглашение 14.621.21.0017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

Литература:

1. Naryzhny S., Zorina E., Kopylov A., Zgoda V., Kleyst O., Archakov A. Next Steps on In-Silico 2DE Analyses of Chromosome 18 Proteoforms // J Proteome Res. 2018 Vol.17. No 12. P. 4085–4096
2. Naryzhny S. Inventory of proteoforms as a current challenge of proteomics: Some technical aspects // J. Proteomics 2018, S1874-3919. No 18. P. 30220-3
3. Петренко Е.С., Копылов А.Т., Клейст О.А., Легина О.К., Белякова Н.В., Пантина Р.А., Нарыжный С.Н. В ПОИСКЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГЛИОБЛАСТОМЫ: АНАЛИЗ ПРОТЕОФОРМ ГЛИОБЛАСТОМНЫХ КЛЕТОК // Цитология. – 2018. – Т. 60, No. 7. – С. 519-523

UDC 577.112.083

DIVERSITY OF PROTEOFORM AS A SOURCE OF SPECIFIC ONCOMARKERS

Naryzhny S.N.^{1,2}, Zorina E.S.¹, Kopylov A.T.¹, Kleist O.A.², Belyakova N.V.², Legina O.K.², Ronzhina N.L.²

¹ B.V. Orekhovich Scientific Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121, Russia

² B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Research Center "Kurchatov Institute", Gatchina, 188300, Russia

e-mail: snaryzhny@mail.ru

On the basis of a comparative analysis of the profiles of the proteoforms of normal and cancer cells, potential specific tumor markers of glioblastoma and hepatocarcinoma were preliminarily identified.

Key words: proteoform; oncomarker

Analysis of tumor markers, including protein markers, is one of the important stages in the diagnosis and treatment of cancer. Currently, many tests are used based on their definition. However, all these tests can give both false positive and false negative results. Therefore, ideally specific markers, which are detected only in case of a disease, have always been the cherished goal of oncologists. The detection and implementation of such biomarkers will make a big step towards personalized medicine, improving the diagnosis and effectiveness of treatment of cancer. Proteomics has recently made some progress in identifying protein diversity (proteolysis, processing, splicing, post-translational modifications ...), which is expressed in the presence of different forms of each protein - proteoforms. This diversity is dynamic and in the case of oncology it is increased many times due to cancer heterogeneity. In our studies in the analysis of normal and cancer cells, we use electrophoretic methods of separation of proteoforms (two-dimensional electrophoresis, isoelectrofocusing and semi-virtual two-dimensional electrophoresis) with subsequent detection by liquid chromatography mass spectrometry (ESI - LC MS / MS). At present, we have accumulated a sufficiently large amount of data, a detailed analysis of which allowed us to identify potential specific tumor markers of glioblastoma and hepatocarcinoma. Among them there are proteoforms not only of those proteins that are already on the list of tumor markers, but also of some others.

The study was performed in frames of Program of Fundamental Research of State Academies of Sciences for 2013-2020. Mass-spectrometry measurements were performed using the equipment of "Human Proteome" Core Facilities of the Institute of Biomedical Chemistry (Russia) which is supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation (unique project ID RFMEFI62117X0017).

References:

1. Naryzhny S., Zorina E., Kopylov A., Zgoda V., Kleyst O., Archakov A. Next Steps on In-Silico 2DE Analyses of Chromosome 18 Proteoforms // *J Proteome Res.* 2018 Vol.17. No 12. P. 4085–4096
2. Naryzhny S. Inventory of proteoforms as a current challenge of proteomics: Some technical aspects // *J. Proteomics* 2018, S1874-3919. No 18. P. 30220-3
3. Petrenko E.S., Kopylov A.T., Kleyst O.A., Legina O.K., Belyakova N.V., Pantina R.A., Naryzhny S.N.. SEARCHING FOR SPECIFIC MARKERS OF GLIOBLASTOMA: ANALYSIS OF PROTEOFORMS OF GLIOBLASTOMA CELLS // *Cell and Tissue Biology* 2018 Vol.12. No 6. P. 455–459

УДК 543.51

СОЗДАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОФИЛИРОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕПТИДОМА МОЧИ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ БЕРЕМЕННОСТИ НА БАЗЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ.

Кононихин А.С.^{1,2,4}, Сергеева В.А.^{3,4}, Муминова К.Т.¹, Стародубцева Н.Л.^{1,2}, Бугрова А.Е.^{1,3}, Индейкина М.И.^{1,3}, Педриоли П.⁵, Захарова Н.В.^{3,1}, Попов И.А.^{1,2}, Ходжаева З.С.², Франкевич В.Е.², Аберсольд Р.⁵, Сухих Г.Т.², Николаев Е.Н.^{1,3,4,6}

¹Московский физико-технический институт, Москва,

e-mail: alex.kononikhin@gmail.com

²НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва,

³Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

⁴Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва

⁵Институт молекулярной и системной биологии ЕТН, Цюрих, Швейцария

⁶Сколковский институт науки и технологий, Московская область, Одинцовский район, деревня Сколково

Разработан подход для дифференциальной диагностики гипертензивных осложнений беременности по пептидомному профилю мочи методом масс-спектрометрии высокого разрешения.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, пептиды, гипертензия, преэклампсия, протеомика

Цель исследования. Разработать подход для дифференциальной диагностики гипертензивных осложнений беременности по пептидомному профилю мочи методом масс-спектрометрии высокого разрешения.

Материал и методы. В исследование было включено 109 женщин, разделенных на группы: преэклампсия (ПЭ), ПЭ на фоне ХАГ (хроническая артериальная гипертензия), ХАГ, ГАГ и группа контроля. Образцы мочи, полученные от каждой женщины, были проанализированы при помощи нано-ВЭЖХ-МС/МС, а также проведен качественный анализ MALDI-MS. Идентификация и анализ полуколичественных данных проводился с использованием комплементарных биоинформационных платформ (MaxQuant, PEAKS).

Результаты. Разработан подход для всестороннего анализа пептидома мочи, который включает в себя пробоподготовку с помощью эксклюзионной хроматографии, идентификацию выделенных пептидов с помощью нано-ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье, а также полуколичественный и статистический анализ данных [1]. При использовании LC-MS/MS, MALDI-MS и секвенирования de novo были проведены исследования, касательно секвенирования новых пептидов и белков, которых пока нет в протеомных базах данных [2]. Для дифференциальной диагностики преэклампсии на фоне других гипертензивных нарушений было проведено сравнение пептидного профиля мочи беременных с гипертензивными осложнениями, не сопровождающимися преэклампсией (ХАГ, ГАГ, норма). Для всех групп были выявлены характерны общие пептиды, которые являются в основном фрагментами коллагена (COL1A1;COL3A1 и др.). Пептиды мочи оказались высокоспецифичными к наличию/отсутствию артериальной гипертензии при беременности [3]. Для группы пациенток с преэклампсией (ПЭ, ПЭ на фоне ХАГ) была выявлена характерная панель пептидов, которые являются фрагментами белка альфа-1-антитрипсина (SERPINA1).

Заключение. Разработан подход для всестороннего анализа пептидома мочи, который включает в себя пробоподготовку с помощью эксклюзионной хроматографии, идентификацию выделенных пептидов с помощью нано-ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье. В результате сравнительного анализа была сформирована панель пептидов, позволяющих достоверно дифференцировать гипертензивные расстройства у беременных. Фрагменты альфа-1-антитрипсина подтвердили свою значимость как маркеры преэклампсии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ грантов: 16-54-21011 ШНФ, 17-08-01537 А, 18-315-00435 мол_а.

Литература:

1. Kononikhin AS, Sergeeva VA, Bugrova AE, Indeykina MI, Starodubtseva NL, Chagovets VV, Popov IA, Frankevich VE, Pedrioli P, Sukhikh GT, Nikolaev EN. Methodology for Urine Peptidome Analysis Based on Nano-HPLC Coupled to Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry // *Peptidomics. Methods in Molecular Biology* 2018. Vol. 1719. P.311-318.

2. MI Indeykina, DA Podgrudkov, AS Kononikhin. The author identified by his method: EuPA YPIC challenge solved // EuPA Open Proteomics, 2018 Vol.20. P.1-8.

3. Муминова К.Т., Кононихин А.С., Ходжаева З.С., Шмаков Р.Г., Сергеева В.А., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Стародубцева Н.Л., Франкевич В.Е., Николаев Е.Н., Кан Н.Е., Сухих Г.Т. Дифференциальная диагностика преэклампсии на фоне других гипертензивных нарушений во время беременности с помощью анализа пептидного профиля мочи // Акушерство и гинекология. – 2018. – №8. – С.66-75.

UDC 543.51

A TECHNOLOGY PLATFORM FOR URINE PEPTIDOME PROFILING CHANGES IN PATIENTS WITH HYPERTENSIVE PREGNANCY COMPLICATIONS ON THE BASIS OF HIGH RESOLUTION MASS-SPECTROMETRY.

Kononikhin A.S.^{1,2,4}, Sergeeva V.A.^{2,3}, Muminova K.T.², Starodubtseva N.L.^{1,2}, Bugrova A.E.^{1,3}, Indeykina M.I.^{2,3}, Pedrioli P.⁵, Zakharova N.V.^{3,1}, Popov I.A.^{1,2}, Khodzhaeva Z.S.², Frankevich V.E.², Abersold R.⁵, Sukhikh G.T.² and Nikolaev E.N.^{1,3,4,6}

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia,
e-mail: alex.kononikhin@gmail.com

²V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

³Emanuel Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵Department of Biology, Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zurich, Zurich, Switzerland.

⁶Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia

An approach for differential diagnosis of hypertensive complications of pregnancy by urinary peptide profile by high-resolution mass spectrometry was developed.

Key words: mass-spectrometry, peptides, preeclampsia, hypertensive disorders, proteomics.

The aim of the study was to develop an approach for the differential diagnosis of hypertensive complications of pregnancy by urinary peptide profile by high-resolution mass spectrometry.

Materials and methods. The study included 109 women divided into groups: preeclampsia (PE), PE superimposed on CAH (chronic hypertension), CAH, GAH and control group. Urine samples from each woman were analyzed using nano-HPLC-MS/MS and a qualitative analysis by MALDI-MS was performed. Identification and analysis of semi-quantitative data was carried out using complementary bioinformatics platforms (MaxQuant, PEAKS).

Results. An approach for a comprehensive analysis of the urine peptide was developed, which includes sample preparation using exclusive chromatography, identification of isolated peptides using nano-HPLC in combination with high resolution mass spectrometry, as well as semi-quantitative and statistical data analysis [1]. LC-MS/MS, MALDI-MS and de novo sequencing, studies were conducted on the sequencing of new peptides and proteins, which are not yet available in proteomic databases [2]. For the differential diagnosis of preeclampsia against the background of other hypertensive disorders, the peptide profile of urine of pregnant women was compared with hypertensive complications not accompanied by preeclampsia (CAH, GAH, Norm). Common peptides, which are mainly collagen fragments (COL1A1, COL3A1, etc.), were identified for all groups. Urine peptides were found to be highly specific to the presence/absence of hypertension during pregnancy [3]. A characteristic panel of peptides, which are fragments of alpha-1-antitrypsin (SERPINA1), was revealed for a group of patients with preeclampsia (PE, PE superimposed on CAH).

Summary. An approach for a comprehensive analysis of the urine peptide was developed, which includes sample preparation using exclusive chromatography, identification of isolated peptides using nano-HPLC coupled with high resolution mass spectrometry. A panel of peptides was formed, allowing to reliably differentiate hypertensive disorders in pregnant women. Fragments of alpha-1-antitrypsin confirmed their significance as markers of preeclampsia.

The study was supported by RFBR grants: 16-54-21011 SNF, 17-08-01537 A, 18-315-00435 mol-a.

References:

1. Kononikhin AS, Sergeeva VA, Bugrova AE, Indeykina MI, Starodubtseva NL, Chagovets VV, Popov IA, Frankevich VE, Pedrioli P, Sukhikh GT, Nikolaev EN. Methodology for Urine Peptidome Analysis Based on Nano-HPLC Coupled to

- Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry // *Peptidomics. Methods in Molecular Biology* 2018. Vol. 1719. P.311-318.
2. MI Indeykina, DA Podgrudkov, AS Kononikhin. The author identified by his method: EuPA YPIC challenge solved // *EuPA Open Proteomics*, 2018 Vol.20. P.1-8.
3. Muminov K. T., Kononikhin A. S., Khodzhaeva Z. S., Shmakov R. G., Sergeev V. A., Bugrova, A. E., Indeykina M. I., Starodubtseva N. L., Frankevich V. E., Nikolaev E. N., Kan N. E. Sukhikh G. T. Differential diagnosis of pre-eclampsia compared to other hypertensive disorders during pregnancy by analyzing the urine peptidome profile // *Obstetrics and gynecology*. - 2018. - №8. - P. 66-75.

УДК: 577.2, ББК: 28.07

УЧАСТИЕ РОССИИ В МЕЖДУНАРОДНОМ ПРОЕКТЕ “ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА”

Е.В.Ильгисонис¹, Е.А.Пономаренко¹, А.Т.Копылов¹, В.Г.Згода¹, Е.В.Поверенная¹, А.В.Лисица¹, С.Н.Нарыжный¹, С.П.Радько¹, А.И.Арчаков¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Россия, 119121, , Погодинская, 10,
e-mail: y2463731@mail.ru

Ключевые слова: протеомика, протеом, протеоформы, здоровье

Целью Международного проекта «Протеом человека» является изучение генно-выраженных продуктов с использованием хромо-центрического подхода. Согласно данному проекту, каждая страна, участвующая в проекте, сфокусирована на белках, кодируемых генами одной хромосомы. Российская команда в том числе исследует размер протеома, кодируемого генами хромосомы 18. Он зависит от количества различных протеоформ (ширина) и количества копий протеоформ в биологическом образце (глубина). Если принимать во внимание модификации, то, основываясь на среднем количестве вариаций на ген с NextProt, ширина протеома составляет 0.55-7.14 миллионов видов белков в организме человека. Генами хромосомы 18 кодируются до 100 тысяч протеоформ. Было проведено геноцентричное исследование глубины протеома хромосомы 18 в плазме крови человека, в ткани печени здоровых людей и в линии клетки HepG2. Мы использовали панорамные методы анализа для клеток – RNA секвенирование и шотган LC-MS/MS, совместно с таргетным количественным анализом. Информация о количестве копий транскриптов на клетку была получена с использованием qRT-PCR, в то время как количество копий белков было получено таргетной масс-спектрометрией (SRM) с использованием изотопно-меченных пептидов в качестве стандарта. Сравнение транскриптома и протеома может быть использовано для определения надежности сигналов, полученных таргетной масс-спектрометрией (SRM). На примере 18 хромосомы в ткани печени и линии клетки HepG2 были детектированы и количественно измерены транскрипты и белки, составляющие лишь 63% и 30% от 275 генов хромосомы. Результаты могут быть использованы для создания многоканальных тестовых систем для диагностики социально-значимых заболеваний, а также персональный протеомный профиль и цифровой портрет здоровья человека.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (“Создание фундаментального научного задела для исследования протеома человека”).

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. (2016) *International Journal of Analytical Chemistry*, in print.
2. Archakov A., Aseev A., Bykov V., Grigoriev A., Govorun V., Ivanov V., Khlunov A., Lisitsa A., Mazurenko S., Makarov A.A., Ponomarenko E., Sagdeev R., Skryabin K. (2011) *Proteomics*, 11(10), 1853–1856. DOI:10.1002/pmic.201000540.
3. Sherman J., Molloy M.P., Burlingame A.L. (2012) *Proteomics*, 12(8), 1147–50. DOI:10.1002/pmic.201100459.

UDC: 577.2

RUSSIAN PART IN THE INTERNATIONAL HUMAN PROTEOME PROJECT

E.Ilgisonis¹, E.Ponomarenko¹, A.Kopylov¹, V.Zgoda¹, E.Poverennaya¹, A.Lisitsa¹, S.Naryzhny¹, S.Radko¹, A.Archakov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry, Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya street, 10
e-mail: y2463731@mail.ru

Key words: proteomics, proteome, proteoforms, health

The aim of the International Human Proteome Project project is to study products of gene expression using a chromosome-centric approach. According to this approach, each country participating in the project focused on the proteins encoded by a specific chromosome. Russian team chose to study the size of the proteome, which depends upon the number of different proteoforms (width) and the number of copies of an individual proteoform in a biosample (depth), encoded by chromosome 18 (Chr18). The total human proteome width is expanded taking into account modifications: by using different methods of calculation based on the average number of variations per gene from NextProt, a range of 0.55-7.14 million protein species in the human body was estimated. Chr18 encoded about up to 100 thousand of this number of proteoforms [1]. The gene-centric investigation of proteome depth encoded by Chr18 was performed in the human blood plasma, liver tissue of healthy people and HepG2 cell line [2]. We used panoramic analysis methods for cells - RNA sequencing and shotgun LC-MS/MS, along with the directional measurements for quantitative analysis. Information about the transcripts copy number per cell was obtained by qRT-PCR method, while the copy number of protein (corresponding to given transcripts) was obtained by targeted mass-spectrometry (SRM) with use of isotope-labeled peptides as standards. Comparing transcriptome vs. proteome could be used to confirm the robustness of the signals, detected by SRM. Taking Chr18 as an example, in liver tissue and HepG2 cell line there were confidently detected and measured transcripts and proteins for just 63% and 30% of 275 protein-coding genes, respectively [3]. The results can be used to create multi-channel test-systems for the diagnosis of socially-important diseases as well as a personal proteomic digital image of health.

The work was done within the framework of the State Academies of Sciences Fundamental Scientific Research Program for 2013-2020 («Fundamental scientific backbone for human proteome investigations»).

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. (2016) *International Journal of Analytical Chemistry*, in print.
2. Archakov A., Aseev A., Bykov V., Grigoriev A., Govorun V., Ivanov V., Khlunov A., Lisitsa A., Mazurenko S., Makarov A.A., Ponomarenko E., Sagdeev R., Skryabin K. (2011) *Proteomics*, 11(10), 1853–1856. DOI:10.1002/pmic.201000540.
3. Sherman J., Molloy M.P., Burlingame A.L. (2012) *Proteomics*, 12(8), 1147–50. DOI:10.1002/pmic.201100459.

ФИЛЬТРАЦИЯ ДАННЫХ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ПОМОЩЬЮ СВЕРТОЧНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Кашкинов М.И., Кертес-Фаркаш А.

Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»
Департамент Анализа Данных и Искусственного Интеллекта, Факультет Компьютерных Наук
125319, Москва, Кочновский проезд, д. 3
e-mail: mikashkinov@edu.hse.ru

Ключевые слова: Биоинформатика, Протеом человека, Идентификация пептидов, Анализ данных тандемной масс-спектрометрии

Аннотация: Масс-спектрометрический анализ пептидов, полученных с помощью протеолиза - это один из наиболее распространенных методов идентификации белков. Существенную роль в анализе масс-спектров играет поиск по базе данных - выявление сходства между экспериментально полученным спектром и теоретическими спектрами известных пептидных цепочек. Ввиду физикохимических факторов, масс-спектры содержат шум, который затрудняет поиск. Как правило пики, которые значительно ниже остальных, удаляют из спектра, чтобы избавиться от шума. Однако, множество низкоинтенсивных пиков содержат

полезную информацию, которую можно использовать. В данной работе мы предлагаем метод, использующий сверточные нейронные сети, который позволяет автоматически выучить информативность каждого пика в спектре. Наша модель обучается восстанавливать позиции пиков в спектре по окружению каждого пика. Благодаря тому, что центральный вес сверточного ядра был зафиксирован на 0, нам удалось избежать переобучения и получить веса, отражающие информативности окружающих пиков. В результате мы смогли снизить интенсивности шумовых пиков, что значительно улучшило качество поиска.

FILTERING OF TANDEM MASS SPECTROMETRY DATA USING CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORKS

Kashkinov M.I., Kertesz-Farkas A.

*National Research University «Higher School of Economics»
Department of Data Analysis and Artificial Intelligence, Faculty of Computer Science,
125319, Moscow, Kochnovskiy dr. 3
e-mail: mikashkinov@edu.hse.ru*

Key words: Bioinformatics, Human Proteome, Peptide Identification, Tandem Mass-Spectrometry Data Analysis

Abstract: Mass spectrometry analysis of peptides obtained by proteolysis is one of the most common approaches for identifying proteins in biological samples. An essential part of the analysis is database searching in which each mass spectrum is compared against a database of either theoretically or experimentally computed peptide spectra. Due to physiochemical factors, mass spectra contain a lot of noise which affects database searching. Auxiliary peaks are usually considered as noise and excluded from the input spectra. However, many of these peaks contain useful information which could be exploited. In this talk, we introduce an approach to automatically learn the importance of each peak in a spectrum that utilizes convolutional neural networks. The model is trained to reconstruct the peak positions in the input spectra from their auxiliary peaks. By forcing center weight of the convolution kernel to zero we managed to avoid over-fitting and learn the weights that correspond to the importance of auxiliary peaks. As a result, we can decrease the intensities for noise peaks which significantly improves the peptide identification performance.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

БИОМАТЕРИАЛЫ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ И МЕДИЦИНЕ

BIOMATERIALS IN BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

1. БИОСОМЕСТИМЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ СОПОЛИМЕРОВ N-ВИНИЛ-2-ПИРРОЛИДОНА КАК СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР, Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И.	67
BIOCOMPATIBLE NANOPARTICLES BASED ON AMPHIPHILIC COPOLYMERS OF N-VINYL-2-PYRROLIDONE AS A DRUG DELIVERY SYSTEM THROUGH THE BLOOD-BRAIN BARRIER, Kuskov A.N., Kulikov P.P., Shtilman M.I.	68
2. БИОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕЛЕВЫХ КОМПОЗИЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ПГМБ ГХ И ЭФИРНЫЕ МАСЛА, Тихонова Т.В., Буторова И.А., Кривошепов А.Ф., Смагина В.В., Кусков А.Н.	69
BIOCIDE ACTIVITY OF GEL COMPOSITIONS CONTAIN PGMB-GC AND ESSENTIAL OILS, Tikhonova T.V., Butorova I.A., Krivoshchepov A.F., Smagina V.V., Kuskov A.N.	70
3. ВИРУСЫ РАСТЕНИЙ КАК АДЪЮВАНТ И ПЛАТФОРМА ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ АНТИГЕНОВ ПРИ СОЗДАНИИ ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ, Е.М.Рябчевская, Д.Л.Грановский, Е.А.Евтушенко, Н.А.Никитин, О.В.Карпова	70
PLANT VIRUSES AS ADJUVANT AND PLATFORM FOR ANTIGENS STABILIZATION FOR NEW-GENERATION ANTHRAX VACCINE DESIGNING, E.Ryabchevskaya, D.Granovskiy, E.Evtushenko, N.Nikitin, O.Karpova	72
4. ВЛИЯНИЕ АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ НА ЛЕНГМЮРОВСКИЕ СЛОИ DPPC КАК МОДЕЛЬНОЙ БИОМЕМБРАНЫ, Куликов Е.А., Ступников А.А., Куликова И.С., Малахова Ю.Н., Селищева А.А.	73
THE EFFECT OF ASTAXANTINE AND ITS ESTERS ON DPPC LANGMUIR FILMS AS MODEL BIOMEMBRANE, Kulikov E.A., Stupnikov A.A., Kulikova I.S., Malakhova Y.N., Selishcheva A.A.	74
5. ВЛИЯНИЕ АЭРАЦИИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫРАЩИВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ, Ситникова А.Е., Гладышева Е.К., Скиба Е.А., Будаева В.В., Шавыркина Н.А.	76
AERATION EFFECT ON CULTIVATION EFFICIENCY OF BACTERIAL NANOCELLULOSE, A.E. Sitnikova, E.K. Gladysheva, E.A. Skiba, V.V. Budaeva, N.A. Shavyrkina	77
6. ВЛИЯНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СПЛАВА Тl-20NB-10ТА, Конушкин С.В., Сергиенко К.В., Баскакова М.И., Беспамятнова А., Севостьянов М.А., Колмаков А.Г.	78
EFFECT OF THERMAL TREATMENT ON MECHANICAL PROPERTIES OF Tl-20NB-10TA ALLOY, Konushkin S.V., Sergienko K.V., Baskakova M.I., Bepamiatnova A., Sevostyanov M.A., Kolmakov A.G.	79
7. ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ТЕРБИЯ И ДИПИКОЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ, Шпунтова Д.В., Вострикова А.М., Митрофанова А.Н., Бакал А.А., Горячева И.Ю.	80
INFLUENCE OF PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS ON THE OPTICAL PROPERTIES OF THE COMPLEX OF TERBIUM AND DIPICOLINIC ACID, Shpuntova D.V., Vostrikova A.M., Mitrofanova A.N., Bakal A.A., Goryacheva I.Yu.	80
8. ДИСТАНЦИОННОЕ УПРАВЛЕНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ ПАРЫ ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА НАНОЧАСТИЦАХ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ТИПА ГАНЕТЛЬ, С ПОМОЩЬЮ НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ, Веселов М.М., Коломоец Н.И., Ефремова М.В., Головин Ю.И., Клячко Н.Л.	81
REMOTE CONTROL BIOCATALYTIC REACTION OF ENZYME-INHIBITOR COUPLE, IMMOBILIZED ON DUMBBLE-LIKE MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES, UNDER LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELD, Veselov M.M., Kolomoec N.I., Efremova M.V., Golovin Yu.I., Klyachko N.L.	82
9. ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА IN VITRO ПРИ РАЗНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕЙТЕРИЯ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ, Злацкий И.А., Злацкая А.В., Антипова Н.В., Васильев Р.Г., Zubov Д.А., Сыроешкин А.В.	84

DIFFERENT DEUTERIUM CONCENTRATION IN CULTURE MEDIUM INDUCE METABOLIC ACTIVITY CHANGES IN HUMAN NORMAL AND CANCER CELLS IN VITRO , Zlatskiy I.A., Zlatska A.V., Antipova N.V., Vasyliov R.G., Zubov D.A., Syroeshkin A.V.	85
10. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЗОЛЕЙ СЕРЕБРА В КАЧЕСТВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ДОБАВОК КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ, Лебедева Д.И., Кривошепов А.Ф., Буторова И.А., Тихонова Т.В., Смагина В.В., Агафонова О.А.	86
APPLICATION OF SILVER HYDROSOLS AS ANTIMICROBIAL ADDITIVES FOR COMPOSITIONS BASED ON HUMIC ACIDS, Lebedeva D.I., Krivoshchepov A.F., Butorova I.A., Tikhonova T.V., Smagina V.V., Aganfonova O.A.	87
11. ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА СРЕДАХ С АНТИБИОТИКАМИ, Голубев Д.С., Скиба Е.А., Будаева В.В., Шавыркина Н.А., Гладышева Е.К.	88
A STUDY OF CULTIVATION OF BACTERIAL CELLULOSE IN MEDIA WITH ANTIBIOTICS, D.S. Golubev, E.A. Skiba, V.V. Budaeva, N.A. Shavyrkina, E.K. Gladysheva	89
12. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИМЕРНОЙ КОМПОЗИЦИИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, Баикин А.С., Севостьянов М.А., Насакина Е.О., Каплан М.А., Краев И.Д., Колмаков А.Г.	90
STUDY OF MECHANICAL PROPERTIES OF POLYMERIC COMPOSITION OF MEDICAL PURPOSE, Baikin A.S., Sevostyanov M.A., Nasakina E.O. , Kaplan M.A. , Kraev I.D., Kolmakov A.G.	91
13. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ СФЕРИЧЕСКОГО ПОРОШКА Ti-6Al-4V, Каплан М.А., Смирнов М.А., Калайда Т.А., Кирсанкин А.А., Севостьянов М.А.	92
PROPERTIES OF SPHERICAL Ti-6Al-4V POWDER, Kaplan M.A., Smirnov M.A., Kalaida T.A., Kirsankin A.A., Sevostyanov M.A.	95
14. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ БИОПОВРЕЖДЕНИЙ И КЛЕЙКОСТИ ХЛОПКОВОГО ВОЛОКНА, Е.Л. Пехташева, Е.Е. Масталыгина, И.В. Лусинян, Н.А. Ибрагимова	97
STUDY OF THE RELATIONS BETWEEN BIODETERIORATION AND STICKINESS OF COTTON FIBER, E.L. Pekhtasheva, E.E. Mastalygina, I.V. Lusinyan, N.A. Ibragimova	98
15. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ ЭПР СПИНОВЫХ ЗОНДОВ И РЕНТГЕНО-ДИФРАКЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРА NT-1505 НА СТРУКТУРУ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ, Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Кривандин А.В., Голощапов А.Н.	99
THE STUDY BY ESR AND X-RAY DIFFRACTION ANALYSIS OF THE EFFECT OF THE NEUROPROTECTOR NT-1505 ON THE STRUCTURE OF THE SYNAPTOSOMAL MEMBRANES, Gerasimov N. Yu., Nevrova O.V., Krivandin A.V., Goloshchapov A.N.	99
16. МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА "НИКЕЛИД ТИТАНА – ТИТАН – ХИТОЗАН", Сударчикова М.А., Насакина Е.О., Каплан М.А., Баскакова М.И., Царева А.М., Устинова Ю.Н., Севостьянов М.А., Колмаков А.Г.	100
MECHANICAL CHARACTERISTICS OF THE COMPOSITE MATERIAL "TITANIUM NICKELIDE - TITAN - CHITOSAN", Sudarchikova M.A., Nasakina E.O., Kaplan M.A., Baskakova M.I., Tsareva A.M., Ustinova Yu.N., Sevostyanov M.A., Kolmakov A.G.	101
17. МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ С ТЕРМОПЛАСТИЧНЫМ КРАХМАЛОМ ДЛЯ БИОРАЗЛАГАЕМОЙ УПАКОВОЧНОЙ ПЛЕНКИ, Лукин Н.Д., Колпакова В.В., Усачев И.С., Сарджвеладзе А.С., Соломин Д.А., Васильев И.Ю.	102
MODIFICATION OF POLYMER COMPOSITIONS WITH THERMOPLASTIC STARCH FOR BIO-DEPENDABLE PACKAGING PRODUCTS, Lukin N. D., Kolpakova V.V., Usachev I.S., Sarjvelazhde A.S., Solomin D.A., Vasilyev I.Yu.	103
18. НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ПОЧВЕ НАТРИЕВЫМИ СОЛЯМИ АМИНОКИСЛОТ, Аладин Д.Ю., Севостьянов С.М., Деева Н.Ф., Дёмин Д.В.	104
NEUTRALIZATION OF ORGANOCHLORINE COMPOUNDS IN THE SOIL WITH SODIUM SALTS OF AMINO ACIDS Aladin D., Sevostyanov S., Deeva N., Demin D.	105
19. НОВЫЕ НАНОРАЗМЕРНЫЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ, Штильман М.И., Кусков А.Н., Куликов П.П., Лусс А.Л., Джеджея В.Т., Гусев С.А., Gurevich L., Nelemans L.C. ,Christiansen G., Tsatsakis A.M.	106
NEW NANOSIZED MACRO MOLECULAR SYSTEMS FOR MEDICAL BIOTECHNOLOGY, Shtilman M.I., Kuskov A.N., Kulikov P.P., Luss A.L., Jedzheya V.T., Gusev S.A., Gurevich L., Nelemans L.C., Christiansen G., Tsatsakis A.M.	107

20. ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ГИДРОМОДУЛЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ ПОСУДЫ НА ОСНОВЕ ОТХОДОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА, Павловская Н.Е., Горькова И.В., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Гуляева К.Н.	108
OPTIMIZATION OF THE COMPOSITION OF A HYDROMODULE TO CREATE A BIOGRAPHABLE PLANT ON THE BASIS OF AGRICULTURAL PRODUCTION WASTE, Pavlovskaya N.E., Gor'kova I.V., Gagarina I.N., Gavrilova A.Yu., Gulyaeva K.N.	108
21. ОПТИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА, КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И БИОМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ, Веселова И.А., Еремина О.Е., Македонская М.И., Барсукова М.Е., Гудилин Е.А., Шеховцова Т.Н.	109
SOLID-STATE OPTICAL SENSOR SYSTEMS FOR MEDICAL DIAGNOSTICS, QUALITY CONTROL OF RAW PLANT MATERIAL, AND ENVIRONMENTAL MONITORING, Veselova I.A., Eremina O.E., Makedonskaya M.I., Barsukova M.E., Goodilin E.A., Shekhovtsova T. N.	110
22. ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАН-ПЕКТИНОВЫХ МИКРОЧАСТИЦ, НАГРУЖЕННЫХ ДОКСОРУБИЦИНОМ, Ковалева Д.И., Красноштанова А.А.	110
OBTAINING CHITOSAN-PECTIN MICROPARTICLES LOADED WITH DOXORUBICIN, Kovaleva D.I., Krasnoshtanova A.A.	111
23. РАЗРАБОТКА МЕДИАТОРНОГО БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ PARACOCUS YEEI BKM B-330, А.С.Харькова, С.В.Алферов, В.А.Арляпов.	112
DEVELOPMENT OF BOD-BIOSENSOR BASED ON BACTERIA PARACOCUS YEEI BKM B-330, A.Kharkova, S.Alferov, V.Arlyapov.	113
24. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ МОДЕЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ, Кувшинова Е.А., Петракова Н.В., Сергеева Н.С., Тетерина Н.Ю., Каралкин П.А., Свиридова И.К.	115
DEVELOPMENT OF THE SURFACE FUNCTIONALIZATION METHOD OSTEOPLASTIC MATERIALS BY MODEL PROTEINS, Kuvshinova E.A., Petrakova N.V., Sergeeva N.S., Teterina A.Y., Karalkin P.A., Sviridova I.K.	116
25. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, Кузнецова М.С., Буторова И.А., Сардушкин М.В.	117
DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR ANTIMICROBIAL ACTION ANALYSIS OF COSMETIC PRODUCTS, Kuznetsova M.S., Butorova I.A., M.V. Sardushkin.	118
26. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ТЕТРАЦИКЛИНА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАН-АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ, Приходько Д.В., Красноштанова А.А.	119
DEVELOPMENT OF THE DRUG DELIVERY SYSTEM OF TETRACYCLINE ON THE BASIS OF CHITOSAN-ALGINATE MICROPARTICLES, Prikhodko D.V., Krasnoshtanova A.A.	120
27. СОЗДАНИЕ УСТОЙЧИВОГО БИОЦИДНОГО СЛОЯ НА СТЕКЛЯННОЙ ПОВЕРХНОСТИ, Беловежец Л.А., Мареев А.В.	121
THE FORMATION OF A RESISTANT BIOCIDAL FILM ON THE GLASS SURFACE, Belovezhets L.A., Mareev A.V.	122
28. СПЛОШНЫЕ И ПОРИСТЫЕ БИОМАТЕРИАЛЫ ИЗ СВЕРХУПРУГИХ СПЛАВОВ НА ОСНОВЕ Ti-ZR-Nb ДЛЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ, В.А. Шереметьев, С.А. Дубинский, Ю.С. Жукова, А.А. Коробкова, А.С. Кудряшова, М.Р. Филонов, С.Д. Прокошкин, В. Браиловский.	123
BULK AND POROUS BIOMATERIALS BASED ON SUPERELASTIC Ti-ZR-Nb ALLOYS FOR BONE IMPLANTS, V. Sheremetyev, S. Dubinskiy, Y. Zhukova, A. Korobkova, A. Kudryashova, M. Filonov, S. Prokoshkin, V. Brailovski.	124
29. СРАВНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ ДЕКСТРАНСУЛЬФАТА НАТРИЯ И ТАНИНОВОЙ КИСЛОТЫ, Митрофанова А.Н., Вострикова А.М., Шпунтова Д.В., Бакал А.А., Сухоруков Г.Б., Горячева И.Ю.	125
COMPARISON OF OPTICAL CHARACTERISTICS OF CARBON NANOPARTICLES OBTAINED ON THE BASIS OF DEXTRAN SULFATE SODIUM SALT AND TANNIC ACID, Mitrofanova A.N., Vostrikova A.M., Shpuntova D.V., Bakal A.A., Sukhorukov G.B., Goryacheva I.Yu.	126
30. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ТИТАНА И ТИТАНОВЫХ СПЛАВОВ С ЭФФЕКТОМ ПАМЯТИ ФОРМЫ IN VITRO, Сергиенко К.В., Конушкин С.В., Беспамятнова А.	126
COMPARATIVE EVALUATION OF BIOSAFETABILITY OF TITANIUM AND TITANIUM ALLOYS WITH MEMORY EFFECT OF THE FORM IN VITRO, Sergienko K.V., Konushkin S.V., Bepamiatnova A.	127
31. ТЕРМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРНЫХ НАНОКОМПОЗИТОВ, АРМИРОВАННЫХ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗОЙ, А.Н. Перова, А.В. Хватов, С.М. Ломакин.	128

THERMAL PROPERTIES OF THE NANOCELLULOSE REINFORCED POLYMER NANOCOMPOSITES, A. Perova, A. Khvatov, S. Lomakin.....	130
32. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРЕХ КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК, Васильева С.А., Коровина Д.Г., Легонькова О.А., Савченкова И.П.....	131
TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF THREE COMMERCIAL DRUGS IN CELL CULTURE, Vasileva S.A., Korovina D.G., Legon'kova O.A., Savchenkova I.P.	132
33. УГЛЕРОДНЫЕ СОРБЕНТЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГИДРОКСИКИСЛОТАМИ, С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ И ПРОТИВОГРИБКОВЫМИ СВОЙСТВАМИ, Пьянова Л.Г., Герунова Л.К., Делягина М.С., Лавренов В.А., Седанова А.В.....	133
HYDROXYACID MODIFIED CARBON SORBENTS WITH ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL PROPERTIES, P'yanova L.G., Gerunova L.K., Delyagina M.S., Lavrenov A.V., Sedanov A.V.	134
34. ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЗНИКЕЛЕВОГО СПЛАВА ПАМЯТИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, Баскакова М.И., Насакина Е.О., Конушкин С.В., Сергиенко К.В., Каплан М.А., Сударчикова М.А., Царева А.М., Устинова Ю.Н., Севостьянов М.А., Колмаков А.Г.	135
CHARACTERISTICS OF NON-NICKEL SHAPE MEMORY ALLOY OF MEDICAL APPOINTMENT, Baskakova M.I., Nasakina E.O., Konushkin S.V., Sergienko K.V., Kaplan M.A., Sudarchikova M.A., Tsareva A.M., Ustinova Yu.N., Sevostyanov M.A., Kolmakov A.G.	136
35. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЙ ЦЕРИЯ, О.А. Легонькова, А.И. Коротаева, И.А. Чекмарева, С.А. Ухин, О.В. Паклина.....	137
EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF CERIUM COMPOUND BIOMEDICAL PROPERTIES, O.A. Legon'kova, A.I. Korotaeva, I.A. Chekmareva, S.A. Ukhin, O.V. Paklin.....	138

УДК 615.45.015

БИОСОМЕСТИМЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ СОПОЛИМЕРОВ N-ВИНИЛ-2-ПИРРОЛИДОНА КАК СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И.

Кафедра биоматериалов, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125047, Москва, Миусская пл., д. 9
e-mail: a_n_kuskov@mail.ru

Были разработаны амфифильные сополимеры на основе N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, ковалентно связанной с флуоресцентной меткой, подобраны оптимальные условия для формирования наночастиц на основе полученных сополимеров и подтверждена их возможность преодоления гемато-энцефалического барьера.

Ключевые слова: амфифильный сополимер; наночастица; N-винил-2-пирролидон; акриловая кислота; гемато-энцефалический барьер

Амфифильные сополимеры на основе N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты были получены по методике, описанной ранее [1]. Как известно, амфифильные полимеры способны образовывать различные мицеллярные структуры в водных средах [2]. Благодаря наличию гидрофобной области у таких структур, становится возможным включать в нее водонерастворимые биологически активные вещества [3]. Наличие же реакционно способных карбоксильных групп в гидрофильной оболочке обеспечивает простоту модификации частицы различными векторами и маркерами, что позволяет использовать такие частицы для таргетной доставки БАВ, в том числе, и через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Синтезированные амфифильные сополимеры N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты (содержание акриловых звеньев ~5 мольн. %) модифицировали флуоресцентным маркером (5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат N-сукцинимидиловый эфир) методами карбодиимидной химии. Далее на основе модифицированного амфифильного полимера эмульсионным методом получали наноразмерные частицы. В

качестве модельного БАВ использовали флуоресцентный краситель DiI (1,1'-диооктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбодиамина перхлорат).

Совместно с университетом Отто фон Герике (Магдебург, Германия) были проведены *in vivo* исследования способности полученных наночастиц преодолевать ГЭБ. Для этого использовался метод конфокальной нейровизуализации сетчатки (ICON).

В результате было показано, что описанные выше наночастицы проходят через ГЭБ и накапливаются в тканях сетчатки глаза подопытных животных (крысы Wistar) уже через 10 минут после инъекционного введения водных суспензий наночастиц в хвостовую вену животных.

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. Kulikov P.P., Goryachaya A.V., Luss A.L., Shtilman M.I., Kuskov A.N. *Amphiphilic poly-N-vinyl-2-pyrrolidone: synthesis, properties, nanoparticles* // *Polymer Science. Series D*. 2017. V. 10 (3). P. 263-268.
2. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Goryachaya A.V., Shtilman M.I., Tzatzarakis M.N., Tsatsakis A.M., Velonia K. *Self-assembled amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for hydrophobic drugs: stability aspects* // *Journal of Applied Polymer Science*. 2018. V. 135 (1). P. 45637.
3. 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.

UDK 615.45.015

BIOCOMPATIBLE NANOPARTICLES BASED ON AMPHIPHILIC COPOLYMERS OF N-VINYL-2-PYRROLIDONE AS A DRUG DELIVERY SYSTEM THROUGH THE BLOOD-BRAIN BARRIER

Kuskov A.N., Kulikov P.P., Shtilman M.I..

*Biomaterials department, Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
125047 Moscow, Miusskaya sq., 9
e-mail: a_n_kuskov@mail.ru*

Amphiphilic copolymers based on N-vinyl-2-pyrrolidone and acrylic acid covalently bonded to a fluorescent label were developed, optimal conditions were selected for the formation of nanoparticles based on the copolymers obtained and their possibility of overcoming blood-brain barrier was confirmed.

Key words: amphiphilic copolymer; nanoparticle; N-vinyl-2-pyrrolidone; acrylic acid; blood-brain barrier

Amphiphilic copolymers based on N-vinyl-2-pyrrolidone and acrylic acid were obtained according to the procedure described previously [1]. As it is known, amphiphilic polymers are capable of forming various micellar structures in aqueous media [2]. Due to the presence of a hydrophobic region in such structures, it becomes possible to include water-insoluble biologically active substances [3]. The presence of reactive carboxyl groups in the hydrophilic shell provides the ease of modifying the particle with different vectors and markers, which allows using such particles for targeted delivery of biologically active substances, including through the blood-brain barrier (BBB).

Synthesized amphiphilic copolymers of N-vinyl-2-pyrrolidone and acrylic acid (acrylic unit content ~ 5 mole %) were modified with a fluorescent marker (5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester) using carbodiimide chemistry. Further, based on the modified amphiphilic polymer by the emulsion method, nanoscale particles were obtained. As a model BAS, the fluorescent dye DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) was used.

Together with Otto von Guericke University (Magdeburg, Germany), *in vivo* studies of the ability of the obtained nanoparticles to overcome the BBB were conducted. For this, the method of confocal neuroimaging of the retina (ICON) was used.

As a result, it was shown that the nanoparticles described above pass through the BBB and accumulate in the tissues of the retina of experimental animals (Wistar rats) within 10 minutes after the injection administration into animal caudal vein.

The work of Kuskov A.N. is supported by an internal initiative grant from the Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia. The project number is 009-2018.

The work of Kulikov P.P. is supported by the RFBR grant No. 18-34-00812.

References:

1. Kulikov P.P., Goryachaya A.V., Luss A.L., Shtilman M.I., Kuskov A.N. Amphiphilic poly-N-vinyl-2-pyrrolidone: synthesis, properties, nanoparticles // *Polymer Science. Series D*. 2017. V. 10 (3). P. 263-268.
2. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Goryachaya A.V., Shtilman M.I., Tzatzarakis M.N., Tsatsakis A.M., Velonia K. Self-assembled amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for hydrophobic drugs: stability aspects // *Journal of Applied Polymer Science*. 2018. V. 135 (1). P. 45637.
3. 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.

УДК 579.61, 544.18

БИОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕЛЕВЫХ КОМПОЗИЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ПГМБ ГХ И ЭФИРНЫЕ МАСЛА

Тихонова Т.В., Буторова И.А., Кривошепов А.Ф., Смагина В.В., Кусков А.Н.

Кафедра технологии химико-фармацевтических и косметических средств, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125047 г. Москва, Миусская пл., д.9
e-mail: gluktv@mail.ru

Показано, что гелевые композиции, содержащие ПГМБ-ГХ в сочетании с эфирным маслом тимьяна и базилика, оказывают выраженный биоцидный эффект. Параллельно установлено, что добавление пленкообразователя увеличивает биоцидную активность гелевых композиций в среднем в 4 раза.

Ключевые слова: эфирное масло, ПГМБ-ГХ, ПВП-ВА, антимикробная активность

Разработаны составы гелевых композиций, обладающих высокими потребительскими свойствами (растекаемость, сенсорные характеристики, стабильность при хранении). На основании реологических исследований подобраны оптимальные концентрации пленкообразователя, сополимера поливинилпирролидон/винилацетат (ПВП-ВА), которые лежат в диапазоне (от 0,1 до 0,15 % масс.). В качестве стандартного бактерицидного агента в разрабатываемые гели вводили полигексаметиленбигуанидин гидрохлорид (ПГМБ-ГХ). Введение эфирных масел в композиции позволило решить сразу 2 технологические задачи: исключить присутствие синтетических отдушек и повысить биоцидные свойства составов. В таблице 1 представлены результаты экспериментов по определению количества микробных клеток до и после обработки поверхности кожи рук добровольцев разработанными составами.

Таблица 1. Содержание микробных клеток на поверхности кожи рук добровольцев

№ смыва	Количество микробных клеток на поверхности кожи рук площадью 50 см ²	
	До обработки	После выдержки 5 минут
1	79	5
2	1254	8
3	1416	16
4	274	2

Таким образом, в проделанной работе показано, что композиции, содержащие в качестве активного вещества смесь ПГМБ-ГХ с эфирными маслами тимьяна и базилика оказывают выраженный биоцидный эффект на тест-штаммы микроорганизмов. Параллельно установлено, что добавление пленкообразователя увеличивает биоцидную активность гелевых композиций в среднем в 4 раза.

UDK 579.61, 544.18

BIOCIDE ACTIVITY OF GEL COMPOSITIONS CONTAIN PGMB-GC AND ESSENTIAL OILS

Tikhonova T.V., Butorova I.A., Krivoshechepov A.F., Smagina V.V., Kuskov A.N.

Department of Technology of Chemical Pharmaceutical and Cosmetic Products, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation
125047 Moscow, Miusskaya sq., 9
e-mail: gluktv@mail.ru

It is shown that gel compositions which contain PHMG-HC with thyme and basil essential oils have the obvious biocide effect. It also found that addition of film former increase the biocide activity of gel composition averagely 4 times.

Key words: essential oil, PHMG-HC, PVP-VA, antimicrobial activity

Gel compositions were developed with high consumer properties (spreadability, sense features, stability at storage). Based on rheological investigations main concentrations of film former copolymer polyvinylpyrrolidon/vinylacetate (PVP-VA) have been chosen, which are in the range of 0,1 to 0,15 % mass. Polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG-HC) was introduced in developed gels as a typical bactericidal agent. The addition of essential oils to the compositions let us solve 2 technological problems at once: exclude existence of synthetic fragrances and to increase of biocide properties of compositions. The Table 1 presents the results of experiments on determination of the number of microbial cells at the hand skin surfaces of volunteers before and after treatment.

Table 1. The number of microbial cells at the hand skin surfaces of volunteers.

Flush N	The number of microbial cells at the hand skin surfaces at square 50 sm ²	
	Before treatment	After treatment during 5 min
1	79	5
2	1254	8
3	1416	16
4	274	2

Thus, it has been shown that compositions with the mixture of PHMG-HC with thyme and basil essential oils as an active ingredient provide express biocide impact on test-strains of microorganisms. It also found that addition of film former increase the biocide activity of gel composition averagely 4 times.

УДК: 578.74, ББК: 28.3

ВИРУСЫ РАСТЕНИЙ КАК АДЪЮВАНТ И ПЛАТФОРМА ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ АНТИГЕНОВ ПРИ СОЗДАНИИ ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Е.М.Рябчевская¹, Д.Л.Грановский¹, Е.А.Евтушенко¹, Н.А.Никитин¹, О.В.Карпова¹

¹Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, 1-12,
e-mail: eryabchevskaya@gmail.com

Данная работа посвящена разработке подходов создания рекомбинантной вакцины против сибирской язвы нового поколения на основе протективного антигена *Bacillus anthracis* и структурно-модифицированных частиц вирусов растений в качестве адъюванта и платформы для стабилизации антигена.

Ключевые слова: сибирская язва, вакцины, вирусы растений, адъюванты, стабилизация антигена

Сибирская язва – особо опасное инфекционное заболевание млекопитающих и человека, возбудителем которого является спорообразующая бактерия *Bacillus anthracis*. Лицензированные в настоящее время вакцины для профилактики сибирской язвы имеют ряд недостатков, например использование аттенуированного штамма всегда связано с риском реверсии к патогенной форме, а вакцины на основе фильтрата жидкой культуры имеют неопределенный состав и обладают высокой реактогенностью (Taft et al., 2007). Таким образом, разработка эффективной, безопасной и низкореактогенной рекомбинантной вакцины против сибирской язвы, является чрезвычайно актуальной задачей.

Основной антиген токсина сибирской язвы – протективный антиген (РА – protective antigen) является главным белком, используемым для создания вакцин против сибирской язвы. Однако использование РА в вакцинных препаратах сопряжено с рядом сложностей: РА очень нестабилен (Gupta et al., 2003), и, как и многие другие индивидуальные рекомбинантные белки, низкоиммуногенен, а будучи адсорбированным на гидроксиде алюминия протеолизуется и быстро теряет свою способность индуцировать выработку нейтрализующих антител (Wagner et al., 2012; D'Souza et al., 2013). Поэтому поиск эффективного иммуностимулятора и стабилизатора является ключевым вопросом для создания безопасной и эффективной вакцины против сибирской язвы.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что нагревание одного из наиболее известных растительных вирусов – вируса табачной мозаики (ВТМ) – приводит к перестройке этого палочковидного вируса в сферические частицы (СЧ), не содержащие РНК (Atabekov et al., 2011). Они стабильны в физиологических условиях, абсолютно безопасны для человека и млекопитающих, биodeградируемы, и могут сорбировать на своей поверхности различные белки, что приводит к образованию комплексов СЧ-антиген (Nikitin et al., 2016; Trifonova et al., 2014; Karpova et al., 2012). Показано, что СЧ ВТМ обладают высокими иммуностимулирующими свойствами (Trifonova et al., 2017; Nikitin et al., 2018a). В отдельных исследованиях по токсичности СЧ была продемонстрирована их полная безопасность (Nikitin et al., 2018b,c). Таким образом, СЧ ВТМ являются перспективным носителем и адъювантом для разработки вакцин против сибирской язвы на основе РА.

Впервые на поверхность СЧ ВТМ был адсорбирован белок бактериального происхождения – рекомбинантный РА сибирской язвы. РА эффективно адсорбируется и равномерно распределен по поверхности СЧ. Показано, что РА сохраняет свои антигенные свойства в составе комплекса СЧ-РА. Продemonstrировано, что адсорбция РА на поверхности СЧ стабилизирует антиген сибирской язвы, замедляя протеолиз белка при различных температурах (+4°C, +25°C).

В результате работы впервые были получены комплексы СЧ с рекомбинантным антигеном бактерии сибирской язвы, в которых СЧ играют роль платформы-носителя и стабилизатора. Есть все основания полагать, что СЧ также будут эффективно стимулировать иммунный ответ на сорбированный на их поверхности РА. В дальнейшем комплексы СЧ-РА могут быть использованы в качестве безопасной и эффективной рекомбинантной вакцины против сибирской язвы.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 18–14-00044).

Литература:

1. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // *Journal of General Virology*. 2011. V. 92. №2. P. 453-456.
2. D'Souza A.J.M., Mar K.D., Huang J., Majumdar S., Ford B.M., Dyas B., Ulrich R.G., Sullivan V.J. Rapid deamidation of recombinant protective antigen when adsorbed on aluminum hydroxide gel correlates with reduced potency of vaccine // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2013. V. 102. №2. P. 454-461.
3. Gupta P. K., Chandra H., Gaur R., Kurupati R. K., Chowdhury S., Tandon V., Singh Y., Maithal K. Conformational fluctuations in anthrax protective antigen: a possible role of calcium in the folding pathway of the protein // *FEBS letters*. 2003. V. 554. №3. P. 505-510.
4. Karpova O.V., Nikitin N.A., Chirkov S.N., Trifonova E.A., Sheveleva A.A., Lazareva E.A., Atabekov J.G. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // *Journal of General Virology*. 2012. V. 93. №2. P. 400-407.
5. Nikitin N.A., Matveeva I.N., Trifonova E.A., Puhova N.M., Samuylenko A.Ya., Gryn S.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine // *Data in brief*. 2018a. V. 21. P. 742-745.
6. Nikitin N.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Biosafety of plant viruses for human and animals // *Moscow University biological sciences bulletin*. 2016. V. 71. – №3. P. 128-134.
7. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018b. V. 97. P. 127–133.
8. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Yurkova M.S., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment // *Data in brief*. 2018c. V. 21. P. 1504-1507.

9. Taft S.C., Weiss A.A. Neutralizing activity of vaccine-induced antibodies to two *Bacillus anthracis* toxin components, lethal factor and edema factor // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008. V. 15. №1. P. 71-75.
10. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Gmyl A.P., Lazareva E.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2014. V. 32. №8. P. 1193-1201.
11. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antiviral Research*. 2017. V. 144. №C. P. 27-33.
12. Wagner L., Verma A., Meade B.D., Reiter K., Narum D.L., Brady R.A., Little S.F., Burns D.L. Structural and immunological analysis of anthrax recombinant protective antigen adsorbed to aluminum hydroxide adjuvant // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. V.19 №9 P. 1465-1473.

UDC: 578.74

PLANT VIRUSES AS ADJUVANT AND PLATFORM FOR ANTIGENS STABILIZATION FOR NEW-GENERATION ANTHRAX VACCINE DESIGNING

E.Ryabchevskaya¹, D.Granovskiy¹, E.Evtushenko¹, N.Nikitin¹, O.Karpova¹

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Russia, 119234, Moscow, Leninskie Gory, 1-12
e-mail: eryabchevskaya@gmail.com

This work is devoted to the development of approaches to designing of a new-generation anthrax recombinant vaccine based on *Bacillus anthracis* protective antigen and plant virus structurally-modified particles as an adjuvant and platform for antigen stabilization.

Key words: anthrax, vaccines, plant viruses, adjuvants, antigen stabilization

Anthrax – extremely dangerous animals' and humans' infection disease, which is caused by spore-forming bacteria *Bacillus anthracis*. Vaccines, licensed nowadays for preventing anthrax have some disadvantages, for example using attenuated strain always connected with the risk of reversion to the pathogen form, and vaccines based on the liquid culture filtrate have indeterminate composition and are high reactogenic (Taft *et al.*, 2017). Therefore, the development of effective, safe and non-reactogenic recombinant anthrax vaccine is a very actual assignment.

Main anthrax-toxin antigen – protective antigen (PA) is the key protein for recombinant vaccine development. However using PA in vaccine preparations associated with some difficulties: PA is very unstable (Gupta *et al.*, 2003) and, as many others individual recombinant proteins, is low-immunogenic. Being adsorbed on aluminum hydroxide PA is proteolyzed and rapidly losing its ability to induce neutralizing antibody production (Wagner *et al.*, 2012; D'Sozua *et al.*, 2013). Therefore searching for an effective immunostimulator and stabilizer is the key point for safe and effective anthrax vaccine development.

Previously in our laboratory was shown that the heating of one of the most famous plant virus – Tobacco mosaic virus (TMV) – lead to remodeling of this rod-shaped virions into RNA-free spherical particles (SPs) (Atabekov *et al.*, 2011). They are stable under physiological conditions, absolutely safe for humans and mammals, biodegradable, can adsorb on their surface different proteins. This adsorption leads to the SPs-antigen complexes formation (Nikitin *et al.*, 2016; Trifonova *et al.*, 2014; Karpova *et al.*, 2012). TMV SPs was demonstrated to have high immunostimulating properties (Trifonova *et al.*, 2017, Nikitin *et al.*, 2018a). In separate SPs toxicity studies their absolute safeness was demonstrated (Nikitin *et al.*, 2018b,c). Therefore TMV SPs are promising carrier and adjuvant for PA-based anthrax vaccine designing.

For the first time on the SPs surface was adsorbed bacterium-derived antigen – recombinant anthrax PA. PA effectively adsorbs and evenly covered the surface of SPs. PA is shown to save its antigenic properties within SPs-PA complex. It was demonstrated that PA adsorption on the SPs surface stabilize anthrax antigen, decreasing a rate of antigen proteolysis during different temperatures (+4°C, +25°C).

As a result of this work complexes of SPs with anthrax bacterium recombinant antigen were obtained for the first time. SPs within these complexes were shown to play a role of platform and stabilizer. There are good reasons to believe that SPs also will effectively stimulate immune response to the PA adsorbed on their surface. Further SPs-PA complexes could be using as a safe and effective recombinant vaccine against anthrax.

The work was funded by the Russian Science Foundation (grant № 18–14-00044).

References:

1. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // *Journal of General Virology*. 2011. V. 92. №2. P. 453-456.
2. D'Souza A.J.M., Mar K.D., Huang J., Majumdar S., Ford B.M., Dyas B., Ulrich R.G., Sullivan V.J. Rapid deamidation of recombinant protective antigen when adsorbed on aluminum hydroxide gel correlates with reduced potency of vaccine // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2013. V. 102. №2. P. 454-461.
3. Gupta P. K., Chandra H., Gaur R., Kurupati R. K., Chowdhury S., Tandon V., Singh Y., Maithal K. Conformational fluctuations in anthrax protective antigen: a possible role of calcium in the folding pathway of the protein // *FEBS letters*. 2003. V. 554. №3. P. 505-510
4. Karpova O.V., Nikitin N.A., Chirkov S.N., Trifonova E.A., Sheveleva A.A., Lazareva E.A., Atabekov J.G. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // *Journal of General Virology*. 2012. V. 93. №2. P. 400-407.
5. Nikitin N.A., Matveeva I.N., Trifonova E.A., Puhova N.M., Samuylenko A.Ya., Gryn S.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine // *Data in brief*. 2018a. V. 21. P. 742-745.
6. Nikitin N.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Biosafety of plant viruses for human and animals // *Moscow University biological sciences bulletin*. 2016. V. 71. – №3. P. 128-134.
7. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018b. V. 97. P. 127-133.
8. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Yurkova M.S., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment // *Data in brief*. 2018c. V. 21. P. 1504-1507.
9. Taft S.C., Weiss A.A. Neutralizing activity of vaccine-induced antibodies to two *Bacillus anthracis* toxin components, lethal factor and edema factor // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008. V. 15. №1. P. 71-75.
10. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Gmyl A.P., Lazareva E.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2014. V. 32. №8. P. 1193-1201.
11. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antiviral Research*. 2017. V. 144. №C. P. 27-33.
12. Wagner L., Verma A., Meade B.D., Reiter K., Narum D.L., Brady R.A., Little S.F., Burns D.L. Structural and immunological analysis of anthrax recombinant protective antigen adsorbed to aluminum hydroxide adjuvant // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012. V.19 №9 P. 1465-1473.

УДК 544.72.023.221

ВЛИЯНИЕ АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ НА ЛЕНГМЮРОВСКИЕ СЛОИ DPPC КАК МОДЕЛЬНОЙ БИОМЕМБРАНЫ

Куликов Е.А., Ступников А.А., Куликова И.С., Малахова Ю.Н., Селищева А.А.

НИЦ «Курчатовский институт», 123182, Россия, Москва, площадь Академика Курчатова, д. 1
e-mail: www.kulikov.e.a.93@mail.ru

Показано, что астаксантин лучше встраивается в ленгмюровский монослой DPPC, чем эфиры, а также не сильно разрыхляет его. Природный антиоксидант астаксантин, а также его эфиры были выделены экстракцией органическими растворителями из сухой биомассы микроводоросли *Haematococcus pluvialis*.

Ключевые слова: астаксантин, моно- и диэфиры астаксантина, *Haematococcus pluvialis*, ленгмюровские слои

Антиоксидантные свойства каротиноидов играют значительную роль в протекании биохимических процессов в живых организмах, они защищают мембраны живых клеток от разрушения свободными радикалами [1, 2], активными формами кислорода. В последнее время из-за интенсивного разрушения озонового слоя и роста озоновых дыр многократно возросло количество заболеваний раком кожи, а также преждевременного появления морщин и складок в незащищенных одеждой местах (шея, лицо и др.). Поэтому актуальной задачей становится разработка лекарственных препаратов и косметических средств, обладающих антиоксидантными свойствами, которые будут способны защитить клетки от активных форм кислорода. В отличие от гидрофильных антиоксидантов, работающих в цитоплазме клетки, и от

гидрофобных – работающих в липидной мембране, молекула каротиноида астаксантина амфифильна, она способна восстанавливать свободные радикалы как в цитоплазме, так и в мембранах клеток и органелл. Поэтому важно оценить влияние астаксантина и его эфиров на биологические мембраны, традиционными модельными системами которых служат ленгмюровские слои.

Целью данной работы было сформировать и исследовать смешанные ленгмюровские слои DPPC с астаксантином или его эфирами. Были использованы коммерчески доступные DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, Sigma-Aldrich, США), астаксантин (Sigma-Aldrich, США), а также его моно- и диэфиры, выделенные экстракцией ацетоном из сухой биомассы *Haematococcus pluvialis* (Sigma-Aldrich, США) и очищенные колоночной хроматографией. Чистоту астаксантина и его эфиров определяли методом ВЭЖХ с детекцией в видимой области и масс-детекцией.

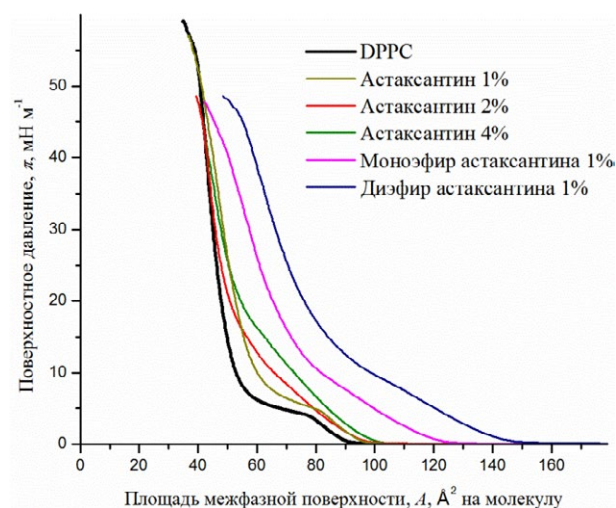


Рис. 1. Изотермы поверхностного давления сжатия ленгмюровских монослоев DPPC и смешанных с астаксантином и его эфирами, $T = 20^\circ\text{C}$.

Были сформированы смешанные ленгмюровские слои DPPC с астаксантином или его эфирами в различных соотношениях (1%, 2%, 4% каротиноида), получены изотермы поверхностного давления (рисунок 1) и поверхностного потенциала, морфология изучена микроскопией под углом Брюстера. Было обнаружено изменение формы изотерм поверхностного давления в области протекания фазового перехода DPPC в смешанных ленгмюровских слоях, увеличение площадей на молекулу, уменьшение давления коллапса. При этом добавление моно- и диэфиров астаксантина сильнее разрыхляет монослой липида, чем неэтерифицированный астаксантин.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-33-80004.

Литература:

1. Гудков С.В. Механизмы образования активных форм кислорода под влиянием физических факторов и их генотоксическое действие : дис. ... докт. биол. наук : 03.01.02. – Пуцино, 2012. – 270с.
2. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111, № 6. – С. 923–932.

UDC 544.72.023.221

THE EFFECT OF ASTAXANTINE AND ITS ESTERS ON DPPC LANGMUIR FILMS AS MODEL BIOMEMBRANE

Kulikov E.A., Stupnikov A.A., Kulikova I.S., Malakhova Y.N., Selishcheva A.A.

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia, 123182, 1 Academician Kurchatov Square
e-mail: www.kulikov.e.a.93@mail.ru

It is shown that astaxanthin is better integrate into the DPPC Langmuir monolayer than ethers, and also does not destroy it much. The natural antioxidant astaxanthin and its esters were isolated by extraction with organic solvents from the dry biomass of microalgae *Haematococcus pluvialis*

Key words: astaxanthin, mono- and diesters of astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, Langmuir films.

Antioxidant properties of carotenoids play a significant role in the course of biochemical processes in living organisms, they protect the membranes of living cells from destruction by free radicals [1, 2], reactive oxygen forms. Recently, due to the intensive destruction of the ozone layer and the growth of ozone holes, the number of skin cancer diseases has multiplied, as well as the premature appearance of wrinkles and folds in places not protected by clothing (neck, face, etc.). Therefore, an actual problem is the development of pharmaceuticals and cosmetic agents having antioxidant properties that are able to protect cells from reactive oxygen species. Unlike hydrophilic antioxidants working in the cytoplasm of the cell, and hydrophobic – working in the lipid membrane, the astaxanthin molecule is amphiphilic, it is capable of restoring free radicals both in the cytoplasm and in cell and organelle membranes. Therefore it is important to evaluate the effect of astaxanthin and its esters on biological membranes, traditional model systems of them are Langmuir films.

The purpose of this work was to form and investigate the mixed Langmuir films of DPPC with astaxanthin or its esters. The commercially available DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Sigma-Aldrich, USA), astaxanthin (Sigma-Aldrich, USA), as well as its mono- and di-esters, separated by acetone from dry biomass of *Haematococcus pluvialis* (Sigma-Aldrich, USA) and purified by column chromatography were used. The purity of astaxanthin and its esters was determined by HPLC with detection in the visible region and with mass-detection.

Langmuir films of DPPC mixed with astaxanthin or its esters were formed in various ratios (1%, 2%, 4% carotenoid), surface pressure isotherms (Figure 1) and surface potential isotherms were obtained, and morphology was studied by Brewster angle microscopy. It has been found the surface pressure isotherms shape change in the region of DPPC phase transition in mixed Langmuir films, increasing the area per molecule, collapse pressure decreasing. Thus the addition of mono- and diesters of astaxanthin stronger loosens the lipid monolayer than unesterified astaxanthin.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 19-33-80004.

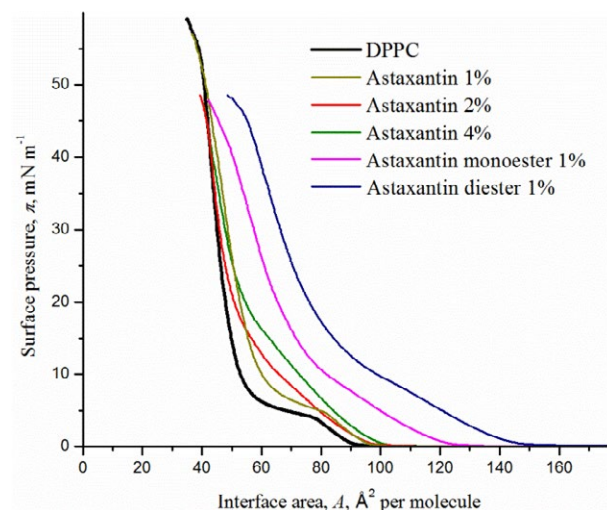


Fig. 1. Dependence of the interfacial surface area of a phospholipid monolayer with the addition of carotenoids on surface pressure

References:

1. Gudkov S.V. Mechanisms of formation of reactive oxygen species under the influence of physical factors and their genotoxic action: dis. ... dr. biol. Sciences: 03.01.02. - Pushchino, 2012. – p. 270.
2. Baraboy V.A.. Mechanisms of stress and lipid peroxidation // Advances in modern biology. – 1991. – Vol. 111, № 6. – P. 923–932.

УДК 577.114

ВЛИЯНИЕ АЭРАЦИИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫРАЩИВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Ситникова А.Е.^{1,2}, Гладышева Е.К.¹, Скиба Е.А.¹, Будаева В.В.¹, Шавыркина Н.А.^{2,1}

1 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, Россия

659322, г. Бийск, Алтайский край, ул. Социалистическая, 1

2 Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Россия

659305, г. Бийск, Алтайский край, ул. Имени Героя Советского Союза Трофимова, 27

e-mail: 32nadina@mail.ru

Исследован процесс наращивания биомассы бактериальной целлюлозы в условиях принудительной аэрации воздухом в объеме 3,3 литра в минуту и без дополнительного введения воздуха в систему. Использование принудительной аэрации не привело к увеличению выхода бактериальной целлюлозы, как и не наблюдалось различий в динамике потребления продуцентом редуцирующих веществ.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, наноцеллюлоза, *Medusomyces gisevii* Sa-12, аэрация

Бактериальная целлюлоза (БЦ) - новый нано материал, который наравне с растительной целлюлозой нашел широкое применение в медицине, производстве косметики и пищевой промышленности [1]. Например, в медицине на основе гелевых пленок БЦ можно делать протезы кровеносных сосудов, восстанавливать кожные покровы при ожогах, воспалениях и ранах [2].

На сегодняшний день доказано, что основными продуцентами БЦ являются бактерии рода *Acetobacter*, *Pseudomonas*, некоторые штаммы родов *Rhizobium* и *Sarcina*. БЦ является компонентом чайного гриба (*Medusomyces gisevii*) и представляет собой симбиоз двух организмов: гриба, составленного из нескольких родов дрожжевых грибов (главным образом из рода *Torula*), и уксуснокислых бактерий (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides* и т. д.) [3].

В ходе исследований проводили выращивание БЦ на синтетической питательной среде культурой *Medusomyces gisevii* Sa-12 в климатической камере Binder, температуру культивирования поддерживали на уровне 27 °С, культуральную среду не перемешивали, культивирование продолжали в течение 24 суток.

Осуществляли два варианта культивирования: без принудительной аэрации и с подачей в камеру воздуха объемом 3,3 литра в минуту. В ходе выращивания пленки БЦ контролировали массу пленки, концентрацию редуцирующих веществ, уровень pH среды.

В результате проведенных исследований было показано, что максимальный выход БЦ (7,80 %) наблюдается в случае без использования принудительной аэрации, и на 0,32% превышает выход БЦ при дополнительном введении воздуха в культуральную систему, что может считаться погрешностью эксперимента. Максимальный выход БЦ был отмечен на 20 сутки культивирования и в дальнейшем практически не увеличивался.

Динамика активной кислотности и потребления редуцирующих веществ имеет сходный характер в обоих случаях: кислотность снижается наиболее интенсивно в первые двое суток культивирования с 4,37 до 2,20-2,50 ед. pH и далее остается практически неизменной на протяжении всего экспериментального периода. Наиболее активно глюкоза потребляется в течение первых 9 суток культивирования, затем ее концентрация медленно планомерно снижается до нулевой отметки на 23 сутки.

Таким образом, при культивировании *Medusomyces gisevii* Sa-12 использование аэрации интенсивностью 3,3 литра в минуту не приводит к увеличению выхода БЦ. Возможно, следует увеличить объем подачи воздуха в камеру.

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

Литература:

1. Болотова, К. С. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы / К. С. Болотова, Д. Г. Чухчин, Л. В. Майер, А. А. Гурьянова // Лесной журнал. 2016. №6. С. 153
2. Ткаченко, А. А. Бактериальная целлюлоза – шедевр наноархитектуры (теория и практика, настоящее и буду-

щее) / А. А. Ткаченко, Т. А. Петрова, А. В. Пиневи́ч. – С.-Петербургский гос. ун-т, 2008. 136 – 155 с.
3. Cannon, R. E. Biogenesis of bacterial cellulose / R. E. Cannon, S. M. Anderson // *Critical Reviews in Microbiology*. 1991. Vol. 17, № 6. P. 435 – 447.

UDC 577.114

AERATION EFFECT ON CULTIVATION EFFICIENCY OF BACTERIAL NANOCELLULOSE

A.E. Sitnikova ^{1,2}, E.K. Gladysheva ¹, E.A. Skiba ¹, V.V. Budaeva ¹, N.A. Shavyrkina ^{2,1}

¹ Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (IPCET SB RAS), ul. Socialisticheskaya 1, Biysk 659322, Altai Krai, Russia

² Biysk Technological Institute, Polzunov Altai State technical University, ul. Trofimova 27, Biysk 659305, Russia
e-mail: 32nadina@mail.ru

The cultivation process of bacterial cellulose biomass both with forced aeration at a flowrate of 3.3 L/min and without supplementary air supply to the system was studied herein. The use of forced aeration did not result in an increased yield of bacterial cellulose as well as no difference was observed in the time profile of reducing sugar consumption by the bacterial producer.

Key words: bacterial cellulose, nanocellulose, *Medusomyces gisevii* Sa-12, aeration

Bacterial cellulose (BC) is a new nanomaterial which, alongside plant cellulose, has found widespread use in medicine, cosmetics and food industry [1]. For example, in medicine, BC gel-films are employed as a scaffold to make blood-vessel prostheses and to repair skin burns, inflammation and injuries [2].

It has been proved to date that the major BC producers are *Acetobacter* and *Pseudomonas* bacteria, and some *Rhizobium* and *Sarcina* strains. BC is a component of the tea fungus *Medusomyces gisevii* and represents a symbiosis of two microorganisms: a fungus composed of several genera of yeasts (chiefly the *Torula* genus) and acetic bacteria (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides* and so forth) [3].

In this study, BC was produced by the *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiont in a synthetic nutrient broth, in a Binder constant climate chamber. The culture temperature was maintained at 27 °C, the growth medium was not agitated, and the culture took place for 24 days.

Two culture variations were performed: without forced aeration and with aeration at a flowrate of 3.3 L/min. During the cultivation of a BC film, the film weight, reducing sugar concentration and pH were controlled.

The study showed that the maximum yield of BC (7.80%) was observed without forced aeration and was 0.32% higher than that with supplementary air supply to the culture system, which can be considered as an experimental error. The maximum yield of BC was noticed at 20 days of culture and did not almost increase onwards.

The time profile of pH and reducing sugar consumption was similar in nature in both cases: pH was decreasing more intensively for the initial 2 days of culture, from 4.37 to 2.20–2.50. pH also further remained unchanged throughout the entire experimental period. Glucose was utilized most actively for the initial 9 days of culture and then its concentration declined slowly and smoothly to zero mark at 23 days.

To sum up, the use of aeration at a flowrate of 3.3 L/min in the cultivation of *Medusomyces gisevii* Sa-12 did not enhance the BC yield. Maybe, the air supply to the chamber should be increased.

The research was supported by the Russian Science Foundation (project #17-19-01054) using equipment provided by the Biysk Regional Center for Shared Use of Scientific Equipment (IPCET SB RAS, Biysk).

References:

1. K.S. Bolotova, D.G. Chukhchin, L.V. Mayer, A.A. Guryanova, Morphological features of the fibrillar structure of plant and bacterial celluloses // *Forestry Journal*. – 206. – No.6. – p. 153.
2. A.A. Tkachenko, T.A. Petrova, A.V. Pinevich, Bacterial cellulose, a masterpiece of nano-architecture (theory and practice, present and future) / *St-Peter. State Uni.* - 2008. 136. – p. 155.
3. R. E. Cannon, S. M. Anderson, Biogenesis of bacterial cellulose / *Critical Reviews in Microbiology*. - 1991. - Vol. 17. - № 6. - pp. 435 – 447.

УДК 620.172.22

ВЛИЯНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СПЛАВА Ti-20Nb-10Ta

Конушкин С.В., Сергиенко К.В., Баскакова М.И., Беспамятнова А., Севостьянов М.А., Колмаков А.Г.

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской Академии Наук, Москва, Россия
 115304, Москва, Каспийская ул., д. 10, кв.84
 e-mail: venev.55@mail.ru

Получена проволока диаметром 280 мкм из сплава Ti-20Nb-10Ta. Исследовано влияние последеформационного отжига на механические свойства проволоки. Показано, что наилучшие механические свойства достигаются при отжиге в течении 1-3 ч при температуре 800°C.

Ключевые слова: сверхупругость; титановые сплавы

В данной работе исследовалось влияние ТО (термической обработки) на механические свойства сплава Ti-20Nb-10Ta (ат. %). Отжиг проводили в вакуумной печи при давлении $1 \cdot 10^{-5}$ мм. рт. ст., скорость нагрева и охлаждения составляли 10°C/мин. Данный сплав рассматривается как возможный кандидат в качестве материала для имплантатов, т.к. сплав состоит только из биосовместимых металлов и проявляет эффект сверхупругости [1, 2].

Проволоку из данного сплава испытывали на статическое растяжение на универсальной испытательной механической машине Instron 3382 (США, 2005 г.) со скоростью нагружения 2 мм/мин. Погрешность измерений испытательной машины составляет менее 1%. Результаты испытаний представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что отжиг в течении 20 мин при температуре 600 – 800°C привел к уменьшению прочностных свойств сплава за счет снятия наклепа. Поэтому время выдержки было увеличено до 1-3 часов. После отжига при температуре 800°C в течении 1-3 часов прочность и пластичность данного сплава значительно увеличилось.

Таблица 1. Свойства сплава Ti-20Nb-10Ta в зависимости от термической обработки

№	Температура и время отжига	Отн. удл., %	Предел текучести, МПа	Предел прочности, МПа	Модуль Юнга, ГПа
1	После волочения	1,89	610	938	47,60
2	600°C, 20 мин	1,11	449,33	624	50,55
3	700°C, 20 мин	0,98	422,33	621,67	41,06
4	800°C, 20 мин	1,08	665,33	826,67	52,43
5	600°C, 1 ч.	3,54	509	717,7	49,38
6	600°C, 3 ч.	2,5	507,3	700,3	51,8
7	800°C, 1 ч.	7,15	694,67	943	60,55
8	800°C, 3 ч.	6	712,3	952,3	56,4

Таким образом была отработана технология последеформационного отжига сплава Ti-20Nb-10Ta. Отжиг с данными параметрами можно применять в качестве промежуточной термической обработки при изготовлении имплантатов.

Работа выполнялась по государственному заданию № 075-00746-19-00.

Литература:

1. Hee Young Kim, Jie Fu, Hirobumi Tobe, Jae Il Kim, Shuichi Miyazaki Published: 1 June 2015 by Springer Nature in Shape Memory and Superelasticity Shape Memory and Superelasticity, Volume 1, pp 107-116
2. E.O. Nasakina, S.V. Konushkin, M.I. Baskakova, I.M. Fedyuk, K.V. Sergienko, A.S. Baikin, M.A. Kaplan, M.A. Sevostyanov, A.G. Kolmakov. The Production of a Thin Wire of Ti-Nb-Ta-Zr Shape Memory Alloy for Medical Devices // J Material Sci Eng (Journal of Material Sciences & Engineering) 2018, Volume 7, Issue 1, 430-436

UDC 620.172.22

EFFECT OF THERMAL TREATMENT ON MECHANICAL PROPERTIES OF Ti-20Nb-10Ta ALLOY

Konushkin S.V., Sergienko K.V., Baskakova M.I., Bepamiatnova A., Sevostyanov M.A., Kolmakov A.G.

A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
115304, Moscow, Kaspiyskaya str., 10, sq. 84
e-mail: venev.55@mail.ru

Ti-20Nb-10Ta wire with a diameter of 280 microns were obtained. The influence of postdeformation annealing on the mechanical properties of the wire was investigated. It is shown that the best mechanical properties are achieved by annealing for 1–3 h at 800°C.

Key words: superelasticity; titanium alloys

In this work, we investigated the effect of HT (heat treatment) on the mechanical properties of the Ti-20Nb-10Ta alloy (at.%). Annealing was carried out in a vacuum furnace at a pressure of $1 \cdot 10^{-5}$ millimeters of mercury, the rate of heating and cooling was 10°C/ min. This alloy is considered as a possible candidate for implants material, since the alloy consists only of biocompatible metals and exhibits a superelastic effect [1, 2].

The wire of this alloy was tested for static tension on the universal mechanical testing machine Instron 3382 (USA, 2005) with a loading speed of 2 mm/min. The measurement error of the test machine is less than 1%. The test results are presented in table 1.

From table 1 it can be seen that annealing for 20 minutes at a temperature of 600 - 800 ° C led to a decrease in the strength properties of the alloy due to the removal of coldhardening layer. Therefore, the exposure time was increased to 1-3 hours. After annealing at 800 ° C for 1–3 hours the strength and ductility of this alloy increased significantly.

Table 1. Properties of the Ti-20Nb-10Ta alloy, depending on the heat treatment

Nº	Annealing temperature and time	Relative extension, %	Yield strength, MPa	Tensile strength, MPa	Young's modulus, GPa
1	After dragging	1,89	610	938	47,60
2	600°C, 20 min	1,11	449,33	624	50,55
3	700°C, 20 min	0,98	422,33	621,67	41,06
4	800°C, 20 min	1,08	665,33	826,67	52,43
5	600°C, 1 h	3,54	509	717,7	49,38
6	600°C, 3 h	2,5	507,3	700,3	51,8
7	800°C, 1 h	7,15	694,67	943	60,55
8	800°C, 3 h	6	712,3	952,3	56,4

Thus, the post-deformation annealing technology for the Ti-20Nb-10Ta alloy was developed. Annealing with these parameters can be used as an intermediate heat treatment in the manufacture of implants.

The work was carried out according to the state task № 075-00746-19-00.

References:

1. Hee Young Kim, Jie Fu, Hirobumi Tobe, Jae Il Kim, Shuichi Miyazaki Published: 1 June 2015 by Springer Nature in Shape Memory and Superelasticity Shape Memory and Superelasticity, Volume 1, pp 107-116
2. E.O. Nasakina, S.V. Konushkin, M.I. Baskakova, I.M. Fedyuk, K.V. Sergienko, A.S. Baikin, M.A. Kaplan, M.A. Sevostyanov, A.G. Kolmakov. The Production of a Thin Wire of Ti-Nb-Ta-Zr Shape Memory Alloy for Medical Devices // J Material Sci Eng (Journal of Material Sciences & Engineering) 2018, Volume 7, Issue 1, 430-436

УДК 543

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ТЕРБИЯ И ДИПИКОЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Шпунтова Д.В., Вострикова А.М., Митрофанова А.Н., Бакал А.А., Горячева И.Ю.

Саратовский государственный университет, Саратов, Россия
Саратовский Государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт Химии, 410012, Саратов, Астраханская, 83
e-mail: daria.shpuntova@gmail.com

Были проведены эксперименты по оптимизации люминесцентных свойств дипиколината тербия. Изучено влияние СВЧ-излучения. Также изучено влияние добавок кислот и оснований и ионной силы на люминесцентные свойства хлорида тербия с целью поиска подходов к включению в углеродные люминесцентные наноструктуры.

Ключевые слова: тербий, дипикололиновая кислота, люминесценция, перенос энергии, биоматериалы.

Комплексные соединения лантаноидов используются в качестве высокочувствительных фотолюминесцентных меток для биоаналитических исследований. Применение комплексных соединений лантаноидов связано с их широким спектром возбуждения и узкими полосами испускания; влияние фоновой биолюминесценции, которая находится в наносекундном диапазоне, исключается благодаря длительному (миллисекунды) времени затухания люминесценции лантаноидов.

Другой особенностью лантаноидов является возможность использования их для конструирования сенсоров на основе флуоресцентного индуктивно-резонансного переноса энергии. В работе был использован перенос энергии («эффект антенны») для увеличения интенсивности люминесценции ионов тербия. В качестве сенситизатора применяли дипикололиновую кислоту. Изучено влияние ионной силы, добавок кислот и оснований (HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 , NaOH) и СВЧ излучения на люминесценцию ионов тербия и комплексов тербия с дипикололиновой кислотой. Показано, что при воздействии СВЧ-излучения интенсивность люминесценции повышается, время жизни остается постоянным. С увеличением концентраций добавок интенсивность люминесценции падает. Таким образом, дипиколонат тербия может быть в перспективе использован как добавка при синтезе углеродных наночастиц.

Работа выполнена при поддержке МОН (проект 4.1063.2017/4.6).

UDC 543

INFLUENCE OF PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS ON THE OPTICAL PROPERTIES OF THE COMPLEX OF TERBIUM AND DIPICOLINIC ACID

Shpuntova D.V., Vostrikova A.M., Mitrofanova A.N., Bakal A.A., Goryacheva I.Yu.

Saratov State University, Saratov, Russia
Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, Institute of Chemistry, 410012, Saratov, Astrakhanskaya, 83
e-mail: daria.shpuntova@gmail.com

Experiments were conducted to optimize of the optical properties of terbium dipicolinate. The effect of microwave radiation on the luminescent properties of terbium dipicolinate was studied as well as the effect of acid and base additives and ionic strength.

Key words: terbium chloride, dipicolinic acid, luminescence, energy transfer, biomaterials.

Lanthanide complexes are used as highly sensitive photoluminescent labels for bioanalytical studies. The use of complex lanthanide compounds is associated with their wide excitation spectrum and narrow emission bands; the effect of background bioluminescence, which is in the nanosecond range, is eliminated due to the long (millisecond) luminescence decay time. Another feature of lanthanides is the possibility of using them for designing sensors based on fluorescent resonant energy transfer (FRET).

In this work "antenna effect" was used to increase the luminescence intensity of terbium ions. Dipicolinic acid was used as a sensitizer. The effect of ionic strength, acids and bases (HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 , NaOH) and microwave

radiation on the luminescence of terbium ions and terbium complexes with dipicolinic acid was studied. It is shown that when exposed to microwave radiation, the luminescence intensity increases, while the lifetime remains constant. When the concentration of additives increases, the luminescence intensity decreases. Thus, terbium dipicolinate can be used in the future as an additive in the synthesis of carbon nanoparticles.

The work was supported by Russian Ministry of Science and Education, project 4.1063.2017/4.6

УДК 577.15

ДИСТАНЦИОННОЕ УПРАВЛЕНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ ПАРЫ ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА НАНОЧАСТИЦАХ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ТИПА ГАНЕТЕЛЬ, С ПОМОЩЬЮ НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Веселов М.М., Коломоец Н.И., Ефремова М.В., Головин Ю.И., Клячко Н.Л.

Химический факультет Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

e-mail: veselov.mac@gmail.com

Проведена иммобилизация α -химотрипсина и ингибитора Бирка-Баумана на наночастицах Fe_3O_4 -Au типа гантель. Показано, что при воздействии магнитного поля частотой 50 Гц на фермент-ингибиторную пару, иммобилизованных на наночастицах, наблюдается полная потеря каталитической активности

Ключевые слова: магнитные наночастицы, низкочастотное магнитное поле, биокатализ, иммобилизация ферментов

Уникальные свойства наноразмерных объектов открывают возможности для создания новых материалов для биотехнологии и биомедицины. Особый интерес представляют магнитные наночастицы. Благодаря высокому соотношению поверхность/объем, а также возможности дистанционного воздействия с помощью внешнего магнитного поля такие наночастицы могут быть использованы для создания биокатализаторов с новыми свойствами. Так, Захарченко с соавторами [1] показали, что индуцируемая постоянным магнитным полем агрегация двух популяций наночастиц Fe_3O_4 , загруженных ферментом и субстратом соответственно, приводит к активации биокаталитической реакции. В данной работе демонстрируется возможность дистанционного «выключения» ферментативной реакции с помощью низкочастотного переменного магнитного поля, вызывающего агрегацию наночастиц Fe_3O_4 -Au типа гантель.

Наночастицы были синтезированы по методике из [2]. Поверхность магнетита была покрыта ПЭГ массой 5 кДа, а поверхность золота – липоевой кислотой. На одной порции наночастиц был иммобилизован фермент α -химотрипсин (МНЧ-Е), а на другой – ингибитор Бирка-Баумана (МНЧ-И). Было изучено влияние магнитного поля частотой 50 Гц на ферментативную активность (гидролиз субстрата N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, pH 8.2, 405 нм) МНЧ-Е и пары МНЧ-Е+МНЧ-И. Смесь МНЧ-Е и МНЧ-И перемешивали 5 минут, добавляли субстрат и кювету помещали в генератор магнитного поля Astra M-SP (Нанодиагностика), записывали кинетическую кривую (3-5 мин), включали поле и продолжали запись еще 5 минут, а затем выключали генератор магнитного поля. Наблюдалось резкое уменьшение угла наклона кинетической кривой (рис 1 а, б) в полях 20 и 100 мТл, а высокоинтенсивное поле (275 мТл) приводило к сильному уменьшению поглощения (рис 1 в). Во всех случаях после отключения магнитного поля наблюдалось восстановление ферментативной активности. В случае МНЧ-Е магнитное поле не оказывало воздействия на скорость реакции (рис 1 г). Подобное поведение объясняется, по-видимому, агрегацией комплекса МНЧ-Е+МНЧ-И под действием магнитного поля (в случае же МНЧ-Е меньшего размера такой агрегации нет).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 17-54-33027 и 18-29-09154.

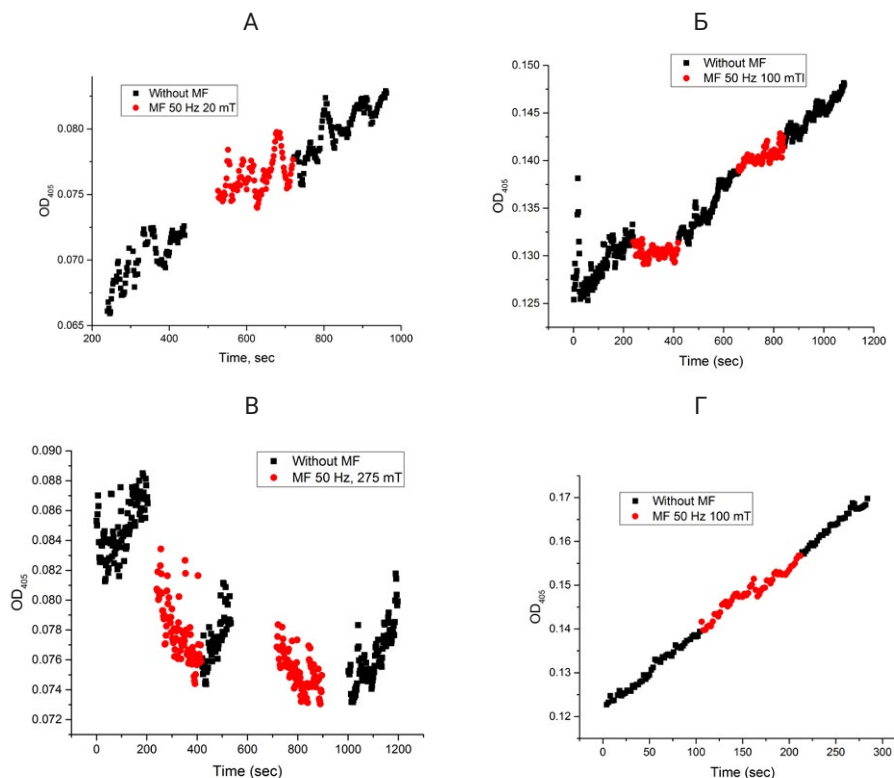


Рис. 1. Влияние магнитного поля частотой 50 Гц на активность химотрипсина, иммобилизованного на наночастицах Fe_3O_4 -Au типа гантель; комплексы МНЧ-Е+МНЧ-И: 20 (А), 100 (Б) и 275 (В) мТл; МНЧ-Е: 100 мТл (Г)

Литература:

1. Zakharchenko A., et al. Magnetic field remotely controlled selective biocatalysis// Nat. Cat. 2018. Vol. 1. P 73-81
2. Efremova M.V., et. al. Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics// Scientific Reports. 2018. Vol 8.

UDC 577.15

REMOTE CONTROL BIOCATALYTIC REACTION OF ENZYME-INHIBITOR COUPLE, IMMOBILIZED ON DUMBBELL-LIKE MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES, UNDER LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELD

Veselov M.M., Kolomoec N.I., Efremova M.V., Golovin Yu.I., Klyachko N.L.

School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 119991, Leninskie Gory, 1-3

G.R. Derzhavin State University, Tambov, Russia, 392000

e-mail: veselov.mac@gmail.com

Immobilization of α -chymotrypsin and Birk-Bowman inhibitor onto dumbbell-like Fe_3O_4 -Au nanoparticles are performed. The total "switch off" the enzyme activity was observed under the action of 50 Hz magnetic field on enzyme-inhibitor complex

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

Unique properties of nanoscale objects open possibilities for creating new materials for biomedicine and biotechnologies. Among such objects, magnetic nanoparticles are of particular interest. Due to their surface/volume ratio and opportunity for distance impact by external magnetic field, such nanoparticles could be used for creating biocatalyst with new properties. Zakharchenko with co-authors [1] have shown that induced by direct magnetic field aggregation of two loaded with enzyme and substrate Fe_3O_4 nanoparticles populations led to a biocatalytic reaction activation. Here, we demonstrate the possibility of distant «turn off» enzymatic reaction via aggregation of dumbbell-like Fe_3O_4 -Au nanoparticles induced by low frequency alternate magnetic field.

The nanoparticles were synthesized according to [2]. Magnetite surface was covered with 5kDa PEG, and gold surface - with lipoic acid. The enzyme, α -chymotrypsin, was immobilized on one portion of nanoparticles (MNP-E) and Birk-Bowman inhibitor - on another (MNP-I). The effect of 50 Hz magnetic field on the enzyme activity in MNP-E and MNP-E+MNP-I was studied (the rate of N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA hydrolysis at 405 nm, pH 8.2). MNP-E and MNP-I were mixed for 5 min, substrate was added, and the cuvette was placed into magnetic field generator Astra-M-SP (Nanodiagnostika). The kinetic curve was recorded for 3-5 min, continued after magnetic field applied for another 5 min, and after the generator turned off. Note, the decrease of kinetic curve slope was observed at low and middle intensity field (20 and 100 mT) (fig. 1 a, b). At higher intensity field (275 mT), we saw even strong absorbance decrease (fig 1 c). In all cases, turning off the magnetic field led to recover of enzymatic activity. Magnetic field didn't affect MNP-E (fig 1 d). Such behavior obviously explained by aggregation of MNP-E+MNP-I complex. At the same time MNP-E, that smaller then MNP-E+MNP-I complex, are more stable and doesn't aggregate under magnetic field.

The work was supported by RFBR 17-54-33027 and 18-29-09154 grants.

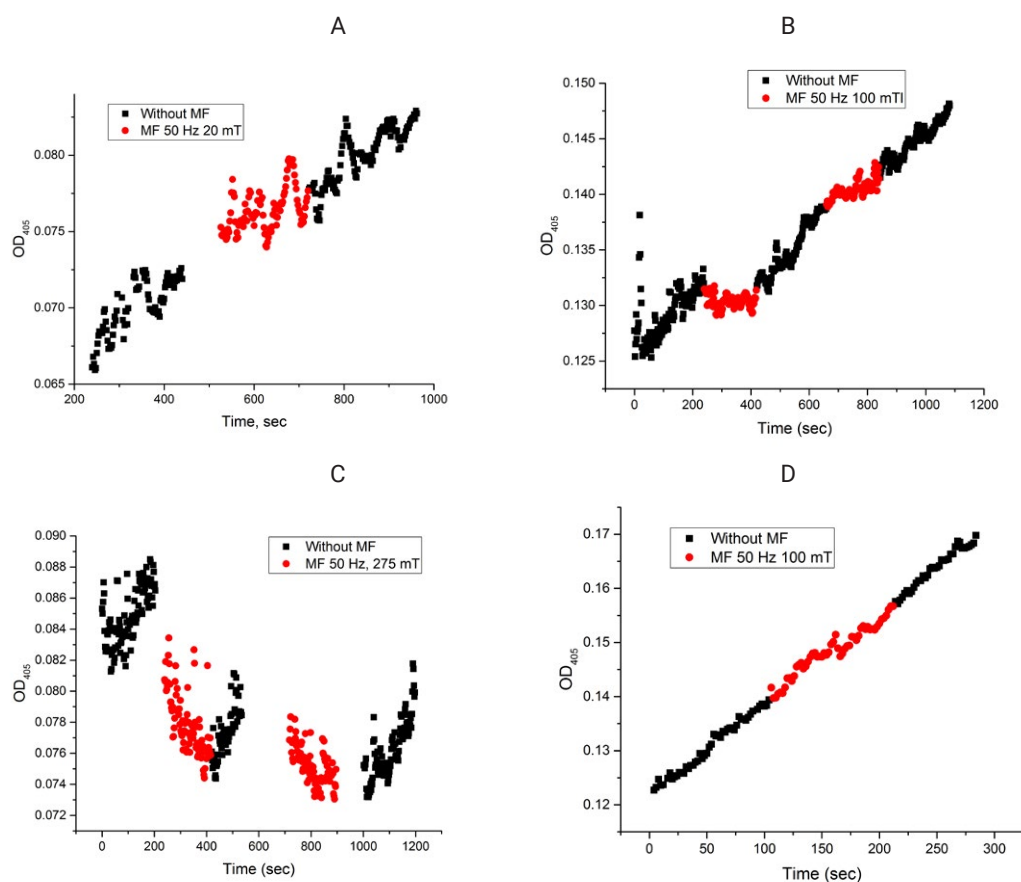


Fig. 1. Chymotrypsin, immobilized onto dumbbell-like Fe₃O₄-Au nanoparticles, activity under impact of 50 Hz magnetic field. (A-C). Kinetic curves of substrate hydrolysis by MNP-E+MNP-I complex under impact 20 (A), 100 (B) and 275 (C) mT field. (D) Kinetic curve for MNP-E under impact of 100 mT field

References:

1. Zakharchenko A., et al. Magnetic field remotely controlled selective biocatalysis// *Nat. Cat.* 2018. Vol. 1. P 73-81
2. Efremova M.V., et. al. Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics// *Scientific Reports.* 2018. Vol 8.

УДК 576.3+612.014.2/3

ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* ПРИ РАЗНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕЙТЕРИЯ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ

Злацкий И.А.¹, Злацкая А.В.^{2,3}, Антипова Н.В.^{1,4}, Васильев Р.Г.^{2,3}, Зубов Д.А.^{2,3}, Сыроешкин А.В.¹

¹Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

²Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ, Киев, Украина

³Биотехнологическая лаборатория, медицинская компания илая, Киев, Украина

⁴Институт биоорганической химии им. Шенякина – Овчинникова РАН, Москва, Россия
 e-mail: zlatskiy@ukr.net

В настоящем исследовании мы показали, что нормальные и раковые клетки *in vitro* в дейтерированной ростовой среде демонстрируют снижение метаболической активности, а в обедненной дейтерием среде повышение.

Ключевые слова: клетки *in vitro*, дейтерий, метаболическая активность

Дейтерий (D) в водных растворах может стимулировать или ингибировать метаболические процессы в живых системах [1]. Целью нашего исследования было изучение метаболической активности нормальных и раковых клеток человека *in vitro* при различной концентрации дейтерия.

Для приготовления питательных сред использовалась вода с различным содержанием дейтерия: вода обедненная дейтерием (ddw, конц. D 0,016 M), дейтерированная вода (конц. D 56 M) (все "Sigma-Aldrich", США) вода с естественным содержанием дейтерия (MiliQ, Великобритания) (конц. D 0,24 M) служила контролем. Содержание дейтерия контролировали Isotopic Water Analyzer-912-0032 (Los Gatos Research Inc., США). Использовали полученные из жировой ткани мезенхимальные стволовые клетки (ADSCs), клеточные линии A549 (рак легких человека) и HT29 (аденокарцинома толстой кишки человека). ADSCs были выделены из образцов жировой ткани пациентов, подвергшихся липосакции. Было получено письменное информированное согласие каждого пациента. Культивирование проводили по стандартному протоколу [2]. Через 24 ч. и 72 ч. в среду добавляли 10% Alamar Blue (Thermo Fisher, США) и инкубировали в течение 3 ч. Восстановленный Alamar Blue был исследовали при 540 нм против 630 нм на спектрофлуориметре Labsystems Multiskan PLUS (США). Метаболическая активность клеток рассчитывалась по формуле [3].

Анализ Alamar Blue является интегральным показателем клеточной метаболической активности, который определяется целостностью плазматической мембраны, интенсивностью гликолиза, дыхательной цепью митохондрий и активностью процессов синтеза [3]. Наше исследование показало, что наиболее интенсивная метаболическая активность наблюдается в ADSCs и раковых клеточных линиях, культивируемых в питательной среде с обедненной дейтерием водой. Ростовая среда с высокой концентрацией дейтерия ингибировала метаболическую активность (табл. 1).

Таблица 1. Метаболическая активность нормальных и раковых клеток человека *in vitro* при различной концентрации D. * - $p < 0,01$ сравнение с контрольной группой

Метаболическая активность, ч	24			72		
Концентрация D, M	контроль 0,24	0,016	56	контроль 0,24	0,016	56
Метаболическая активность A549 (n=50), %	100	108	69*	100	105*	69*
Метаболическая активность HT29 (n=50), %	100	105	72*	100	107	65*
Метаболическая активность ADSCs (n=50), %	100	162*	81*	100	132	69*

Метаболическая активность раковых клеточных линий человека A549 и HT29 меньше в среде с высокой концентрацией дейтерия в сравнении с контролем на основе воды с естественным отношением D/H. Работа выполнена при поддержке программы «РУДН 5-100»

Литература:

1. Huynh M.H.V., Meyer T.J. Colossal kinetic isotope effects in proton-coupled electron transfer // PNAS. 2004. Vol. 101. №36. P. 13138-13141.
2. Zlatska O.V., Zubov D.O., Vasyliov R.G., et al. Deuterium effect on proliferation and clonogenic potential of human dermal fibroblasts *in vitro* // Prob. Cryobiol and Cryomed. 2018. Vol. 28. №. 1. P. 049–053.
3. O'Brien J., Wilson I., Orton T. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // Eur. J. Biochem. 2000. Vol. 267. №17. P. 5421-5426.

UDC 576.3+612.014.2/3

DIFFERENT DEUTERIUM CONCENTRATION IN CULTURE MEDIUM INDUCE METABOLIC ACTIVITY CHANGES IN HUMAN NORMAL AND CANCER CELLS *IN VITRO*

Zlatskiy I.A.¹, Zlatska A.V.^{2,3}, Antipova N.V.^{1,4}, Vasyliov R.G.^{2,3}, Zubov D.A.^{2,3}, Syroeshkin A.V.¹

¹Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

³Biotechnology Laboratory ilaya regeneration, medical company ilaya, Kiev, Ukraine

⁴Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

e-mail: zlatskiy@ukr.net

In current study we have shown the *in vitro* normal and cancer cells in deuterated growth medium demonstrated decrease in metabolic activity. In contrast, in deuterium-depleted medium there was an increase metabolic activity.

Key words: cells *in vitro*, deuterium, metabolic activity

Deuterium (D) in aqueous solutions could stimulate or inhibit metabolic processes in living systems [1]. The aim of our study was to explore metabolic activity of human normal and cancer cells *in vitro* under the different deuterium concentration.

Water with different deuterium content was used for the culture media preparation: deuterium-depleted water (ddw, D concentration 0,016 M), heavy water (D concentration 56 M) (all "Sigma-Aldrich", USA) water with natural deuterium content (MiliQ system, UK) (D concentration 0,24 M) served as control. The deuterium content was monitored by Isotopic Water Analyzer-912-0032 (Los Gatos Research Inc., USA). Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs), cell lines A549 (human lung carcinoma) and HT29 (human colon adenocarcinoma) were used. ADSCs were isolated from adipose tissue samples of patients who had undergone liposuction. Written informed consent from each patient was obtained. The cells were cultured for standard protocol [2]. In 24h and 72h 10% of Alamar Blue (Thermo Fisher, USA) was added to the culture medium and incubated for 3h. Reduced Alamar Blue was detected at 540 nm vs 630 nm at Labsystems Multiskan PLUS spectrofluorimeter (USA). Cell metabolic activity was calculated according to the following formula [3].

Alamar Blue assay is an integrative index of cellular metabolic activity which is determined by plasma membrane integrity, glycolysis intensity, mitochondria respiratory chain and synthesis processes activity [3]. Our study showed that the most intensive metabolic activities was observed in ADSCs and cancer cell lines cultivated in growth medium with deuterium depleted water. Growth medium with high deuterium concentration inhibited metabolic activities (Table 1).

Table 1. Metabolic activities of human normal and cancer cells *in vitro* under the different D concentration. * - p <0.01 comparison to control group.

Exposure time, h	24			72		
Concentration D, M	control 0,24	0,016	56	control 0,24	0,016	56
Metabolic activities cell lines A549 (n=50), %	100	108	69*	100	105*	69*
Metabolic activities cell lines HT29 (n=50), %	100	105	72*	100	107	65*
Metabolic activities cell lines ADSCs (n=50), %	100	162*	81*	100	132	69*

Human cancer cell lines A549 and HT29 metabolic activities slower in growth medium with both high deuterium concentration compared to the water-based control with the natural D/H ratio.

The publication has been prepared with the support of the "RUDN University Program 5-100".

References:

1. Huynh M.H.V., Meyer T.J. Colossal kinetic isotope effects in proton-coupled electron transfer // PNAS. 2004. Vol. 101. №36. P. 13138-13141.
2. Zlatska O.V., Zubov D.O., Vasylyev R.G., et al. Deuterium effect on proliferation and clonogenic potential of human dermal fibroblasts in vitro // Prob. Cryobiol and Cryomed. 2018. Vol. 28. №. 1. P. 049–053.
3. O'Brien J., Wilson I., Orton T. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // Eur. J. Biochem. 2000. Vol. 267. №17. P. 5421-5426.

УДК 579.61, 544.18

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЗОЛЕЙ СЕРЕБРА В КАЧЕСТВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ДОБАВОК КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

Лебедева Д.И., Кривошепов А.Ф., Буторова И.А., Тихонова Т.В., Смагина В.В., Агафонова О.А.

Кафедра технологии химико-фармацевтических и косметических средств, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125047 г. Москва, Миусская пл., д.9
e-mail: afkri@mail.ru

Показано, что в процессе гидролиза торфа в присутствии соли AgNO_3 происходит формирование наночастиц серебра, которые при введении в модельные композиции лечебных грязей проявляют антибактериальную активность.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, гидрозоли серебра, антимикробная активность

Гуминовые кислоты (ГК), составляющие основу органической части торфа, являются природными высокомолекулярными соединениями со сложной структурой [1]. Макромолекулы ГК обладают высокой биологической активностью, что приводит к широкому использованию их в качестве активных компонентов большого количества лекарственных средств, косметических препаратов и БАД [2]. Растворимые формы ГК (Na^+ , K^+ , NH_4^+ соли) получают путем обработки торфа водными растворами соответствующих оснований (гидролиза) при повышенной температуре. Поскольку, исходный торф может иметь недостаточно высокую микробиологическую чистоту, в композиции на основе ГК необходимо вводить антимикробные добавки (стандартные химические консерванты). В тоже время известно, что гидрозоли серебра проявляют ярко выраженные антибактериальные свойства. В этой связи в настоящей работе проведен сравнительный анализ антимикробной активности гидрозолей серебра в модельных композициях лечебных грязей, содержащие ГК. Наиболее распространенным методом синтеза таких золей является химическое восстановление нульвалентного серебра из растворов солей [3]. В качестве восстановителя при получении золей серебра нами предложено использовать сами ГК, поскольку в составе их молекул имеется большое число разнообразных функциональных групп, в том числе способных к реакциям восстановления.

Было установлено, что наночастицы серебра могут формироваться непосредственно в процессе гидролиза торфа при введении в систему соли AgNO_3 .

Для сравнения эффективности антимикробного действия стандартного консерванта Гермабен-2 (0,1% масс.) и наночастиц серебра (0,012% масс.) использовали модельные композиции лечебной грязи, представляющие собой концентрированные суспензии торфа, подвергнутые гидролизу 0,1М раствором NaOH при 60°C. В полученных образцах определяли общее количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) и мицелиальных грибов. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание микроорганизмов в модельных композициях лечебных грязей на основе гуминовых кислот

Композиции лечебной грязи	КМАФАнМ, КОЕ/г	Общее количество мицелиальных грибов, КОЕ/г
Без антимикробных добавок	$4,0 \cdot 10^1$	< 10
С Гермабен II (0,1%)	$1,0 \cdot 10^1$	< 10
С наночастицами серебра (0,012%)	< 10	< 10

Таким образом, как показали исследования, наночастицы серебра в концентрации 0,012% обладают высокой антимикробной активностью и могут использоваться в качестве эффективных антимикробных добавок при получении композиций лечебных грязей на основе гуминовых кислот

Литература:

1. Попов А. И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование // Под ред. Е. И. Ермакова. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та. – 2004. – 248 с.
2. Лотош Т. Д. Экспериментальные основы и перспективы использования препаратов ГК из торфа в медицине и сельскохозяйственном производстве // Биологические науки. – 1991. – № 10. – С. 99-103.
3. Кузьмина Л.Н., Зведенцова Н.С., Колесников Л.В. Получение наночастиц серебра методом химического восстановления // Журнал Российского химического общества имени Д.И. Менделеева. – 2007. – Т. XXX. – №8. – С. 7-12.

UDK 579.61, 544.18

APPLICATION OF SILVER HYDROSOLS AS ANTIMICROBIAL ADDITIVES FOR COMPOSITIONS BASED ON HUMIC ACIDS

Lebedeva D.I., Krivoshchepov A.F., Butorova I.A., Tikhonova T.V., Smagina V.V., Aganfonova O.A.

Department of Technology of Chemical Pharmaceutical and Cosmetic Products, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation
125047 Moscow, Miusskaya sq., 9
e-mail: afkri@mail.ru

It is shown that at peat hydrolysis with AgNO_3 salt take place forming of silver nanoparticles which have antimicrobial activity in therapeutic mud compositions.

Key words: humic acids, silver hydrosols, antimicrobial activity

Humic acids (HA), which are base of organic part of peat, are a nature high molecular structured substances with complicated structure [1]. HA macromolecules have high biological activity, all this results to a wide application of them as active ingredients for pharmaceuticals, cosmetics and biology active additives [2]. Soluble forms of HA (salts of Na^+ , K^+ , NH_4^+) draws by the peat treatment of an aqueous solution of appropriate bases at elevated temperature. However, antimicrobial additives (standard chemical preservatives) must be added to the HA. At this time, it was somehow shown that silver hydrosols have demonstrated antibacterial properties. In this connection we have done a comparative analysis of antimicrobial activity in model therapeutic mud compositions contains HA. The most common method of synthesis such sols is chemical recovery of a non-volatile silver from salts solutions [3]. As a recovery agent we suggested that HA because of varied functional groups including recovery possibilities.

It was found that silver nanoparticles direct may form during the process of peat hydrolysis with AgNO_3 salts.

For comparison of antimicrobial effects, the standard preservative Germaben-2 (0,1% mass.) and nanoparticles (0,012% mass.) was used with therapeutic mud compositions which are concentrated peat suspensions under 0,1M NaOH hydrolysis at 60°C. In the samples was determined the total amount of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (QMAFAnM) and filamentous fungi. The results are shown in table 1.

Table 1. The microorganism in the model therapeutic mud compositions based on humic acids

Therapeutic mud composition	QMAFAnM, CFU/g	Total amount of filamentous fungi, CFU/g
Antimicrobial additives free	4,0•10 ¹	< 10
With Germaben II (0,1%)	1,0•10 ¹	< 10
With Silver nanoparticles (0,012%)	< 10	< 10

Thus, studies have shown that silver nanoparticles in 0.012% mass. have high antimicrobial activity and can be used as a qualitative antimicrobial additive at therapeutic mud compositions production based on humic acids.

References:

1. Popov A. I. Humic substances: properties, construction, education // Edited by E.I. Ermakova. – SPb.: Ed. S.- Petersburg univ. – 2004. – 248 p.
2. Lotos T. D. Experimental foundations and perspectives of using peat humic acid products in medicine and agriculture producing. – 1991. – No. 10. – pp. 99-103.
3. Kuzmina L.N., Zvedentsova N.S., Kolesnikov L.V. Nanoparticle producing by the chemical recovery method // Journal of Russian Chemical society. D.I. Mendeleev. – 2007. – V. XXX. – No. 8. – pp.7-12

УДК 577.114

ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА СРЕДАХ С АНТИБИОТИКАМИ

Голубев Д.С.^{1,2}, Скиба Е.А.^{1,2}, Будаева В.В.¹, Шавыркина Н.А.^{1,2}, Гладышева Е.К.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, г. Бийск, Россия
659322, г. Бийск, Алтайский край, ул. Социалистическая, 1

² Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», г. Бийск, Россия
659305, г. Бийск, Алтайский край, ул. Имени Героя Советского Союза Трофимова, 27
e-mail: reklatekoy@gmail.com

Повышен выход бактериальной целлюлозы при культивировании *Medusomyces gisevii* Sa-12 за счет смещения количественного равновесия культур симбионта в сторону продуцента целлюлозы за счет добавления антибиотиков в питательную среду.

Ключевые слова: микробные полисахариды, бактериальная целлюлоза, наноматериал, *Medusomyces gisevii*

Бактериальная целлюлоза (БЦ) полисахарид, состоящий из β-(1,4) глюкозы. Из-за своих уникальных физико-химических свойств имеет множество приложений в различных отраслях промышленности и медицины.

БЦ продуцируют как индивидуальные штаммы, так и симбиотические культуры такие, например, как *Medusomyces gisevii*. Симбионт имеет сложный состав [1], включающий уксуснокислые бактерии (продуцент БЦ) и дрожжи, выполняющие вспомогательную функцию. Преимущество индивидуальных штаммов заключается в более высоком выходе БЦ и предсказуемости культивирования. Достоинствами симбионта являются устойчивость культуры к контаминации и высокой кристалличности БЦ.

Одним из способов повышения выхода может быть количественное смещение равновесия в симбиотической культуре в пользу продуцента, уменьшая количество вспомогательных микроорганизмов. Целью данной работы является повышение выхода БЦ за счет смещения равновесия при помощи антибиотиков, селективно подавляющих дрожжи.

В исследовании использовался продуцент БЦ симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12. Культивирование проводили на синтетической питательной среде, содержащей 20 г/л глюкозы и 5 г/л черного чая. В среду добавляли противогрибковые препараты флуконазол; тербинафин; клотримазол. Антибиотики вносили в питательную среду в различной концентрации: 0,5; 5,0; 15,0 мг/л. Культивирование проводилось при 27 °C в статических условиях на протяжении 14 суток [2].

Выход БЦ оценивался гравиметрическим методом. Работа выполнена при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

На всех средах при концентрации антибиотиков 0,5 мг/л был получен более высокий выход, чем на среде без добавления противогрибковых препаратов. При концентрациях тербинафина и клотримазола выше 0,5 мг/л в отличие от флуконазола выход БЦ был меньше, чем в контрольном варианте.

Максимальный выход БЦ был получен на среде с добавлением клотримазола и составил 10,77 % (от массы источника углерода), что на 40 % превышает выход контрольного образца на среде без добавления антибиотиков. Перспективность данных результатов заключается в возможности получить продуцент, обладающий преимуществами, как индивидуальных штаммов, так и симбионта.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Литература:

1. Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakraborty W., Bhattacharya D., Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics // *International Journal of Food Microbiology*. 2016. № 220. P. 63–72.
2. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. Vol. 54. № 2. P. 179–187.

UDC 577.114

A STUDY OF CULTIVATION OF BACTERIAL CELLULOSE IN MEDIA WITH ANTIBIOTICS

D.S. Golubev^{1,2}, E.A. Skiba^{1,2}, V.V. Budaeva¹, N.A. Shavyrkina^{1,2}, E.K. Gladysheva¹

¹ Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Socialisticheskaya 1, Biysk 659322, Altai Krai, Russia

² Biysk Technological Institute, Polzunov Altai State technical University, ul. Trofimova 27, Biysk 659305, Russia
e-mail: reklatekoy@gmail.com

The yield of bacterial cellulose during cultivation of *Medusomyces gisevii* Sa-12 was enhanced by shifting the quantitative equilibrium of the symbiont's microorganisms towards the cellulose producer through the means of adding antibiotics to the growth medium.

Key words: microbial polysaccharides, bacterial cellulose, nanomaterial, *Medusomyces gisevii*

Bacterial cellulose (BC) is a polysaccharide composed of β -(1,4) glucose. It has numerous applications in different industries and medicine because of its unique physicochemical properties.

BC is produced both by individual strains and by symbiotic strains such as, for instance, *Medusomyces gisevii*. The symbiont has a complex composition [1] containing acetic bacteria (BC producer) and yeast that performs an auxiliary function. The advantage of individual strains consists in a higher BC yield and predictable culture. The symbiont has merits of being tolerant to contamination and of high BC crystallinity.

One of the ways to improve the yield could be shifting the quantitative equilibrium in the symbiotic strain towards the producer, reducing the amount of auxiliary microorganisms. This study was aimed at enhancing the BC yield by shifting the equilibrium with the aid of antibiotics that selectively inhibit yeast.

A BC producer, symbiotic strain *Medusomyces gisevii* Sa-12, was used in the study. The cultivation was run in a synthetic nutrient broth containing 20 g/L glucose and 5 g/L black tea. To the nutrient broth were added the antifungals Fluconazole, Terbinafine and Clotrimazole. The antibiotics were introduced into the nutrient broth at different concentrations: 0.5, 5.0, 15.0 mg/L. The culture was carried out at 27 °C under static conditions for 14 days [2].

The yield of BC was evaluated by the gravimetric method. The work was performed using instruments provided by the Biysk Regional Center for Shared Use of Scientific Equipment (IPCET SB RAS, Biysk).

All the broths at the antibiotic concentration of 0.5 g/L gave a higher yield than those containing no antibiotics. When Terbinafine and Clotrimazole concentrations were above 0.5 g/L, except for Fluconazole, the yield of BC was lower than that of the control sample.

The maximum yield of BC was obtained in a medium doped with Clotrimazole and accounted for 10.77% (on a carbon source basis), which is 40% higher than that of the control sample obtained in a medium containing no antibiotics. The obtained results are promising because they make it possible to derive a producer that shares

advantages of both individual strains and a symbiont.

The research was supported by the Russian Science Foundation (project #17-19-01054).

References:

1. Chakravorty S. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics / S. Chakravorty, S. Bhattacharya, A. Chatzinotas, W. Chakraborty, D. Bhattacharya, R. Gachhui // *International Journal of Food Microbiology*. – 2016. – No. 220 – pp. 63–72.
2. Gladysheva E.K. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 / E. K. Gladysheva, E. A. Skiba, V. N. Zolotukhin, G. V. Sakovich // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2018. – V. 54 – No. 2 – pp. 179–187.

УДК 620.172.216

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИМЕРНОЙ КОМПОЗИЦИИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Баикин А.С.¹, Севостьянов М.А.¹, Насакина Е.О.¹, Каплан М.А.¹, Краев И.Д.², Колмаков А.Г.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской Академии наук
119334 Россия, г. Москва, Ленинский проспект, 49
e-mail: baikinas@mail.ru

²Федеральное государственное унитарное предприятие Всероссийский научно-исследовательский Институт авиационных материалов
105005, Россия, г. Москва, ул. Радио, д. 17

Исследованы механические свойства полимерной композиции «полисилоксан-связка-хитозан», которая может применяться в медицине для покрытия изделий типа стент и являться матрицей для введения лекарственных препаратов с целью их локальной доставки. Показано, что данный материал отвечает требованиям к механическим свойствам для использования в качестве покрытия стентов.

Ключевые слова: силоксан, хитозан, системы контролируемой доставки лекарственных средств

Разнообразие видов имплантируемых в человеческое тело медицинских изделий различного назначения с каждым годом увеличивается. Однако проблемы, возникающие в связи с реакцией тела на чужеродный объект, так и не нашли окончательных решений и требуют дальнейшего поиска вариантов их устранения.

В работе изучены механические свойства двухслойных полимерных пленок, применяемых для покрытия медицинских изделий типа «стент» с целью локальной доставки лекарственных средств к зоне имплантации и предотвращения возможных послеоперационных осложнений^{1,2}.

Исследования проводили на универсальной испытательной машине INSTRON 3382 со скоростью нагружения 10 мм/мин. Образцы полимерных пленок для испытаний были изготовлены согласно ГОСТ 14236-81, в форме двойной лопатки.

В качестве основы пленок брали биоинертный силоксановый каучук. Поверхностный слой, служащий матрицей для дальнейшего введения лекарственного препарата, наносили из хитозана, который был перемешан со связкой, обеспечивающей адгезию полимерных слоев между собой.

При небольшой прочности (0,95 МПа), образцы показали высокий уровень деформации (более 50%), что соответствует требованиям к полимерным покрытиям для стентов (рис.1)³.

Работа выполнялась по государственному заданию № 075-00746-19-00.

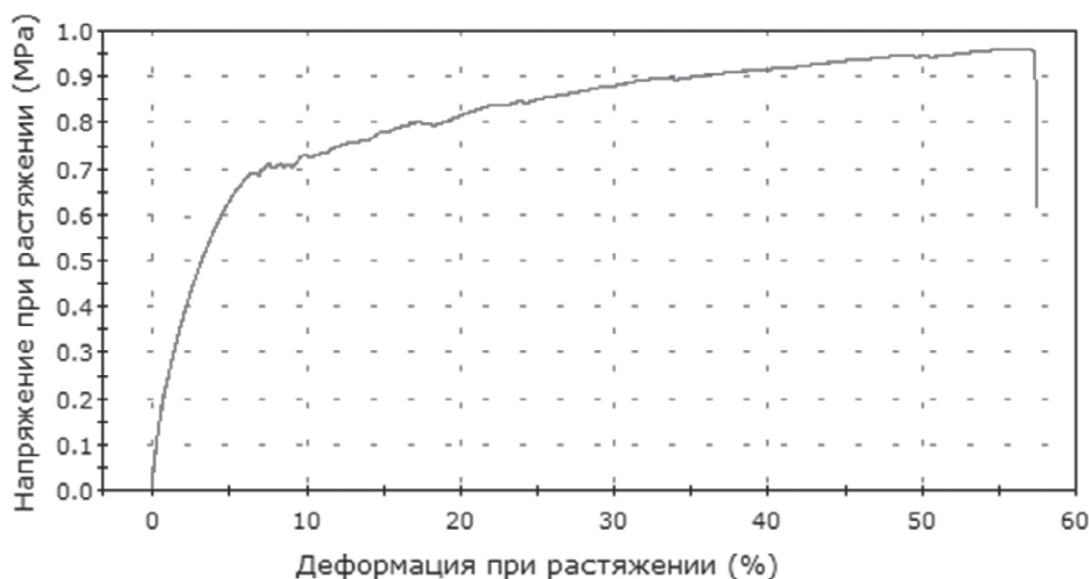


Рис. 1. Диаграмма растяжения образца полисилоксан/связка/хитозан

Литература:

1. Lasprilla A.J., Martinez G.A., Lunelli B.H., Jardim A.L., Filho R.M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnol. Adv.* 2012. Vol. 30(1). P. 321-328.
2. М. А. Севостьянов, А. Ю. Федотов, Е. О. Насакина, А. Ю. Тетерина, А. С. Баикин, К. В. Сергиенко, А. Г. Колмаков, В. С. Комлев, В. Е. Иванов, О. Э. Карп, С. В. Гудков, С. М. Баринов Кинетика высвобождения антибиотиков из биodeградируемых биополимерных мембран на основе хитозана // Доклады академии наук, 2015, том 465, No 2, с. 194–197
3. Saffer E.M., Tew G.N., Bhatia S.R. *Curr. Poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) block copolymers: new directions in self-assembly and biomedical applications.* *Med. Chem.* 2011. Vol. 18(36). P. 5676-5686.

UDC 620.172.216

STUDY OF MECHANICAL PROPERTIES OF POLYMERIC COMPOSITION OF MEDICAL PURPOSE

Baikin A.S.¹, Sevostyanov M.A.¹, Nasakina E.O.¹, Kaplan M.A.¹, Kraev I.D.², Kolmakov A.G.¹

¹A.A.Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences 119334 49 Leninsky Prospect, Moscow, Russia
e-mail: baikinas@mail.ru

²Federal State Unitary Enterprise All-Russian Scientific Research Institute of Aviation Materials State Research Center of the Russian Federation
105005, Russia, Moscow, st. Radio, 17

The mechanical properties of the polymer composition "polysiloxane-binder-chitosan", which can be used in medicine for coating stent-type products and being a matrix for administering drugs for the purpose of their local delivery, have been studied. It is shown that this material meets the requirements for mechanical properties for use as a coating of stents.

Key words: siloxane, chitosan, controlled drug delivery systems

The diversity of types of medical devices implanted into the human body for various purposes is increasing every year. However, the problems arising in connection with the body's response to an alien object have not yet found definitive solutions and require further search for ways to eliminate them.

In this paper, we studied the mechanical properties of two-layer polymer films used to cover medical devices of the "stent" type with the aim of local drug delivery to the implantation zone and prevent possible postoperative complications^{1,2}.

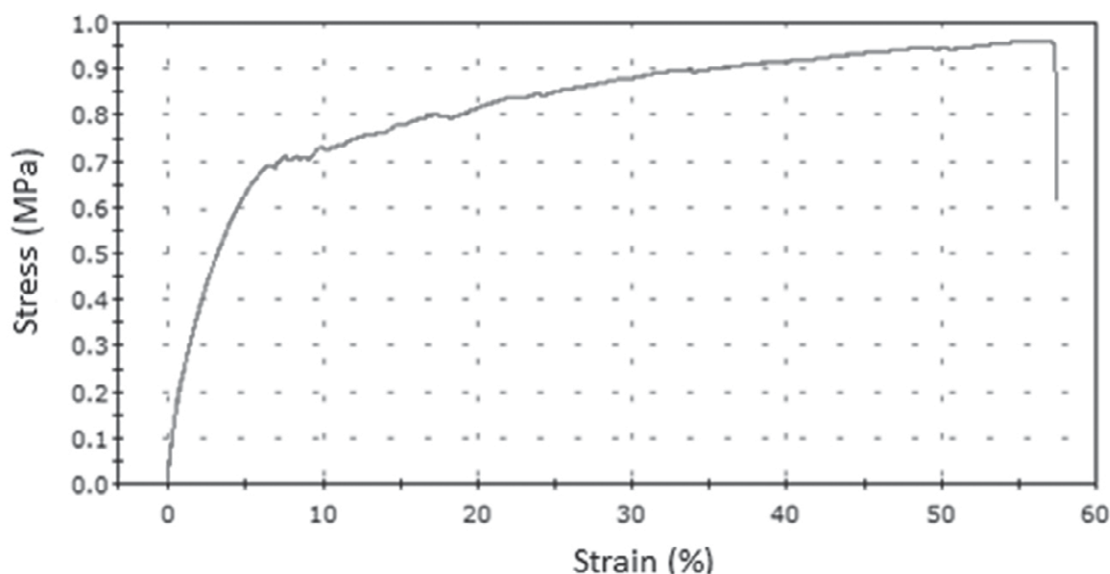


Fig. 1. Sample strain of polysiloxane / ligament / chitosan

Studies were performed on a universal testing machine INSTRON 3382 with a loading rate of 10 mm / min. Samples of polymer films for testing were made according to GOST 14236-81, in the form of a double blade.

Bioinert siloxane rubber was taken as the basis of the films. The surface layer, which serves as a matrix for the further injection of the drug, was applied from chitosan, which was mixed with a bond, which ensures the adhesion of the polymer layers to each other. With a small strength (0.95 MPa), the samples showed a high level of deformation (more than 50%), which meets the requirements for polymer coatings for stents (Fig. 1)3.

The work was carried out according to the state assignment № 075-00746-19-00.

References:

1. Lasprilla A.J., Martinez G.A., Lunelli B.H., Jardini A.L., Filho R.M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnol. Adv.* 2012. Vol. 30 (1). P. 321-328.
2. M.A. Sevostyanov, A.Yu. Fedotov, E.O. Nasakina, A. Yu. Teterina, A.S. Baikin, K.V. Sergienko, A.G. Kolmakov, V.S. Komlev, V. E. Ivanov, O. E. Karp, S. V. Gudkov, S. M. Barinov Kinetics of the release of antibiotics from biodegradable chitosan-based biopolymer membranes // *Reports of the Academy of Sciences*, 2015, vol. 465, No 2, p. 194–197
3. Saffer E.M., Tew G.N., Bhatia S.R. *Curr. Poly (lactic acid) -poly (ethylene oxide) block copolymers: new directions in self-assembly and biomedical applications.* *Med. Chem.* 2011. Vol. 18 (36). P. 5676-5686.

УДК 669-1:620.172

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ СФЕРИЧЕСКОГО ПОРОШКА Ti-6Al-4V

Каплан М.А., Смирнов М.А., Калайда Т.А., Кирсанкин А.А., Севостьянов М.А.

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия
119334, Москва, Ленинский проспект, 49
e-mail: mishakaplan@yandex.ru

Методами сканирующей электронной микроскопии, лазерной дифрактометрии, рентгеноструктурного анализа и методом восстановительного плавления были определены морфология, гранулометрический, примесный и фазовый состав сферического порошка Ti-6Al-4V.

Ключевые слова: Селективное лазерное плавление, СЛП, сферический порошок, титановый сплав, Ti-6Al-4V

Одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений аддитивных технологий является селективное лазерное плавление (СЛП), которое позволяет создавать различные металлические изделия сложной формы. Используя метод селективного лазерного плавления можно добиться существенного

уменьшения массы и снижения стоимости изделия, что важно, например, при изготовлении различных имплантатов [1]. В качестве основного материала для изготовления изделий методом СЛП используются сферические металлические порошки. Сферическая форма порошка необходима для компактной укладки частиц и текучести для равномерной подачи порошка. Титановые сплавы, такие как Ti-6Al-4V, широко применяются в медицине, за счет таких свойств, как малая плотность, высокая удельная прочность и коррозионная стойкость [2-4]. В данной работе методами сканирующей электронной микроскопии, лазерной дифрактометрии, рентгеноструктурного анализа и методом восстановительного плавления были определены морфология, гранулометрический, примесный и фазовый состав сферического порошка Ti-6Al-4V.

Сферический порошок Ti-6Al-4V был получен методом центробежного распыления. Метод центробежного распыления применяется для производства сферических порошков титана и сплавов на его основе. По сравнению с методами распыления в жидкости или газе центробежное распыление может привести к получению высокосферических металлических порошков с низким содержанием примесей, узким распределением частиц по размерам.

Фракционный состав порошка был определен с помощью лазерного дифракционного анализатора размера частиц Analysette 22 NanoTec производителя Fritsch. Принцип работы лазерного дифрактометра основан на измерении углового распределения интенсивности рассеянного света при прохождении лазерного луча через диспергированный образец. Крупные частицы преимущественно рассеивают свет под малыми углами к лазерному пучку, тогда как мелкие частицы - под большими углами. С использованием теории светорассеяния Ми определяют размеры частиц, формирующих индикатрису рассеяния, совпадающую с измеренными данными об угловой зависимости интенсивности рассеянного света. Размер частиц выражается в виде диаметра сферы эквивалентного объема. Исследование морфологии частиц порошка проводилось с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega II SBU, а фазовый состав определяли с помощью рентгеновского дифрактометра «Ultima IV» фирмы «Ригаку». Определение содержания массовой доли кислорода и азота в образцах проводили методом восстановительного плавления в токе инертного газа-носителя с последующим детектированием кислорода в инфракрасной ячейке и азота в кондуктометрической ячейке газоанализатора TC-600 фирмы Leco. В качестве газа-носителя использовался гелий. При определении содержания водорода в образцах использовался также метод восстановительного плавления, только в качестве газа-носителя применялся аргон высокой чистоты. Детектирование водорода осуществлялось в кондуктометрической ячейке газоанализатора RHEN-602 фирмы Leco. Определение содержания углерода проводилось методом восстановительного плавления в керамическом тигле в индукционной печи и детектировалось по количеству выделившегося газообразного CO₂ в инфракрасной ячейке газоанализатора CS-600 фирмы Leco. Результаты исследования приведены в таблице 1.

Таблица 1. Массовая доля кислорода, азота, углерода и водорода в порошке

Сплав	O, %	N, %	C, %	H, %
Ti-6Al-4V	0,195±0,023	0,0008±0,0004	0,02±0,0006	0,00817±0,000336
ASTM F136-02a	0 - 0,13	0 - 0,05	0 - 0,8	0 - 0,012

Как видно из таблицы, порошок титанового сплава Ti-6Al-4V превысил содержание кислорода в соответствии с ASTM F136-02a (порошок титанового сплава для аддитивного производства облегченных изделий как для аэрокосмической и автомобильной промышленности, так и для изготовления имплантатов и компонентов для медицины), что обусловлено, по-видимому, остаточным кислородом в камере. Такое содержание не должно повлиять на дальнейшее производство изделий из порошка и, таким образом, исследуемый порошок можно рекомендовать к использованию для изготовления изделий методом СЛП.

На рисунке 1 представлен гранулометрический состав порошка Ti-6Al-4V. Как можно видеть из диаграммы, в порошке преобладают частицы размером 60 мкм, а разброс составляет приблизительно от 30 до 100 мкм.

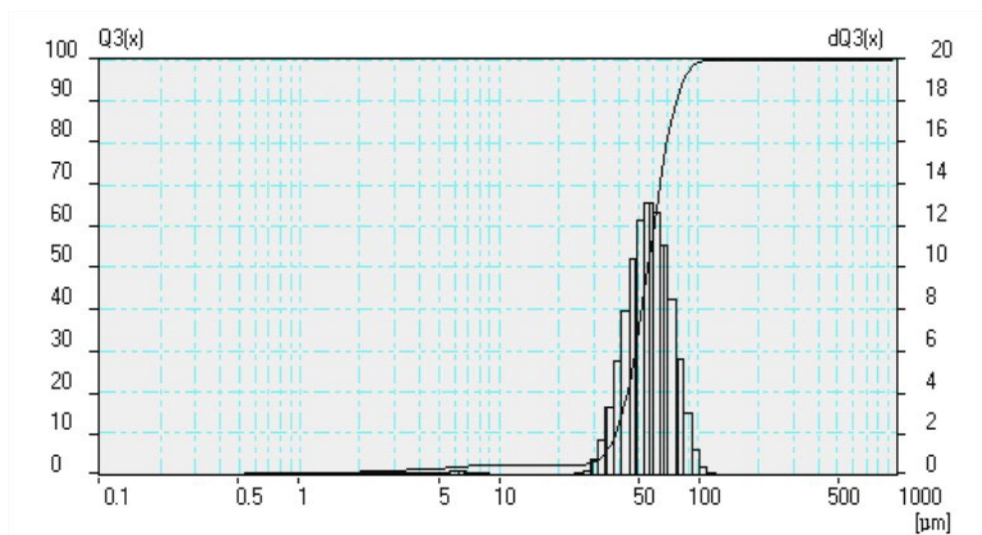


Рис. 1. Гранулометрический состав порошка

На рисунке 2 представлены СЭМ-изображения частиц порошка. Как видно, большинство частиц имеет правильную сферическую форму без видимых дефектов и включений, что должно положительным образом сказаться на текучести порошка.

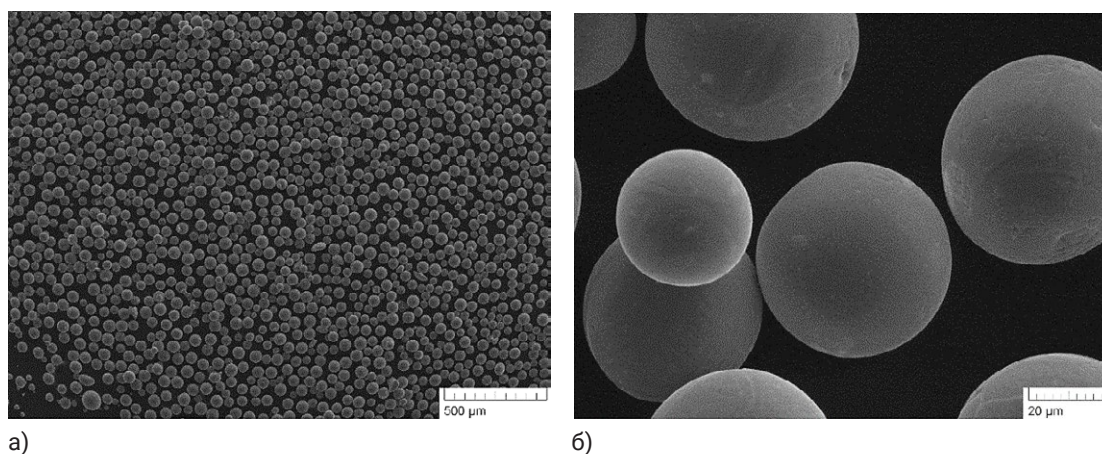


Рис. 2. СЭМ-изображения частиц порошка при разном увеличении: а – $\times 100$; б – $\times 2000$.

Рентгенофазовый анализ показал, что основной объем порошка Ti-6Al-4V является однофазным и состоит из α -твердого раствора на основе Ti. Исследуемые порошки имеют сферическую форму, соответствие со стандартом по неметаллическим включениям и достаточно узкое распределение по размерам, что делает исследуемый порошок рекомендованным к использованию для изготовления изделий методом СЛП.

Работа выполнялась по государственному заданию № 075-00746-19-00.

Литература:

1. M.A. Smirnov, M.A. Kaplan and M.A. Sevostyanov. Receiving finely divided metal powder by inert gas atomization // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 347 (2018) 012033 doi:10.1088/1757-899X/347/1/012033
2. Nasakina E. O., Baikin A. S., Sergiyenko K. V., Leonov A. V., Kaplan M. A., Seryogin A. V., Konushkin S. V., Myasnikova N. V., Sevostyanova M. A., Kolmakov A. G., Simakov S. V. Formation and Investigation of Composite Material Silver-Nitinol for Medical Purposes // Inorganic materials: applied research 2017 Vol. 8 No. 1 pp. 112–117
3. Sevost'yanov M.A., Nasakina E.O., Baikin A.S., Sergienko K.V., Konushkin S.V., Kaplan M.A., Seregin A.V., Leonov A.V., Kozlov V.A., Shkirin A.V., Bunkin N.F., Kolmakov A.G., Simakov S.V., Gudkov S.V. Biocompatibility of new materials based on nano-structured nitinol with titanium and tantalum composite surface layers: experimental analysis in vitro and in vivo // Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2018. Vol. 29. P.33
4. Kaplan M A, Sevost'yanov M A, Nasakina E O, Baikin A S, Sergienko K V, Konushkin S V, Kolmakov A G 2018

Influence of the Surface Modification on the Mechanical Properties of NiTi (55.8 wt % Ni) Alloy Wire for Medical Purposes Inorganic Materials: Applied Research 9 №4 pp 751–756

УДК 669-1:620.172

PROPERTIES OF SPHERICAL Ti-6Al-4V POWDER

Kaplan M.A., Smirnov M.A., Kalaida T.A., Kirsankin A.A., Sevostyanov M.A.

A.A.Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119334, Moscow, Leninsky prospekt, 49
e-mail: mishakaplan@yandex.ru

In this work properties of spherical powders including 304L and 310 grade were determined using scanning electron microscopy, laser diffraction particle size analysis, reductive melting method and X-ray analysis.

Key words: Selective laser melting, SLM, spherical powder, titanium alloy, Ti-6Al-4V

One of the most rapidly developing areas of additive technology is selective laser melting, which allows to create various complex shape products. The selective laser melting can reduce mass and a cost product, that is very important, for example, in the implants manufacturing [1]. Spherical metal powders are used as the initial material for selective laser melting (SLM). The spherical shape of the powder is necessary for good flowability, which directly affect the layer generation capabilities. Titanium alloys, such as Ti-6Al-4V, are widely used in medicine, due to properties such as low density, high specific strength and corrosion resistance [2-4]. In this work properties of spherical powders including 304L and 310 grade were determined using scanning electron microscopy, laser diffraction particle size analysis, reductive melting method and X-ray analysis.

Spherical powder Ti-6Al-4V was obtained by centrifugal atomization process. Centrifugal atomization is a well-established method for the production of fine metal powders. Compared with liquid or gas atomization techniques, centrifugal atomization can produce highly spherical metal powders with low impurity content, narrow particle size distributions, and high production yields. Centrifugal atomization with a rotating disk uses centrifugal force to disintegrate a molten metal stream poured directly onto the middle of a rotating disk, cup, or wheel that is spinning about a vertical axis.

The particle size distributions of powder were determined using an Analysette 22 NanoTec laser diffraction particle size analyzer from Fritsch. The particle size analyzer measuring cell contains the sample particles prepared by the dispersion unit which are irradiated with laser light. By changing the spacing between detector and measuring cell, a different angle range of the scattered light is detected. The particle size distribution is calculated from this data.

The phase composition was determined by an Ultima IV X-ray diffractometer (Rigaku, CuK α radiation) with a graphite monochromator that is intended for the use of different polycrystalline inorganic and organic substances, metals, alloys, films, coatings, and composites with a vertical goniometer and D/teX high-rate semiconductor detector using CuK α radiation according to the Bragg–Bretano method and by the oblique incidence technique with a fixed rotation angle of the X-ray tube.

The Leco TC-600 is a software-controlled instrument that measures both nitrogen and oxygen in a wide variety of metals, refractories, and other inorganic materials. The inert gas fusion principle is employed. A weighed sample, placed in a high-purity graphite crucible, is fused under a flowing helium gas stream at temperatures sufficient to release oxygen, nitrogen, and hydrogen. The oxygen in the sample combines with the carbon from the crucible forming primarily carbon monoxide (CO). In some instances, depending upon sample type and furnace temperature, some oxygen can be released directly as carbon dioxide (CO). The nitrogen present in the sample releases as molecular 2 nitrogen, and any hydrogen present is released as hydrogen gas. Hydrogen determination by inert gas fusion thermal conductivity detection of the Leco RHEN-602 gas analyzer. The Leco CS-600 system is designed for wide-range measurement of carbon and sulfur content of metals, ores, ceramics, and other inorganic materials.

Scanning electron microscope (SEM) Tescan Vega II SBU with an INCA Energy unit for energy dispersive analysis was used to study the surface morphology and to carry out the fractographic investigation of the specimens after the static tests.

Measuring of oxygen, nitrogen, carbon and hydrogen content was carried out using gas analyzers TC-600 from Leco, RHEN-602 from Leco, CS-600 from Leco. The results of the study are shown in table 1.

Table 1. Impurity content (mass %).

Alloy	O, %	N, %	C, %	H, %
Ti-6Al-4V	0,195±0,023	0,0008±0,0004	0,02±0,0006	0,00817±0,000336
ASTM F136-02a	0 - 0,13	0 - 0,05	0 - 0,8	0 - 0,012

As can be seen from the table oxygen content of Ti-6Al-4V powder is slightly more than in ASTM F136-02a (titanium alloy powder for additive production of lightweight products for both the aerospace and automotive industries, and medicine. Such content should not affect the further production of products from powder however, the test powder can be recommended for it use.

The phase composition was determined by an Ultima IV X-ray diffractometer. X-ray diffractometer showed that Ti-6Al-4V powders consists of an α -solid solution based on Ti.

The particle size distributions of spherical powder Ti-6Al-4V is shown in Figure 1. Ti-6Al-4V powder consist 30-100 μm size particles.

Figure 2 shows the SEM images of powder particles. As can be seen, most of the particles have a regular spherical shape, without a typical defects or satellites.

The studied powders have a spherical shape, conformity with the standard for non-metallic inclusions and a rather narrow size distribution, which makes the investigated powder recommended for use for the manufacture of products using the SLM method.

The work was carried out according to the state task № 075-00746-19-00.

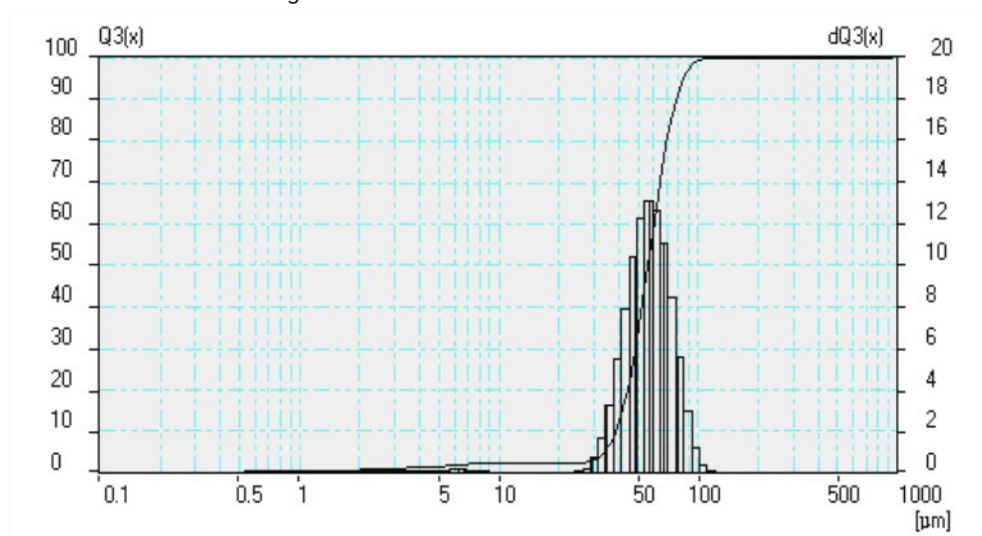


Fig. 1. Particle size distribution of the powder

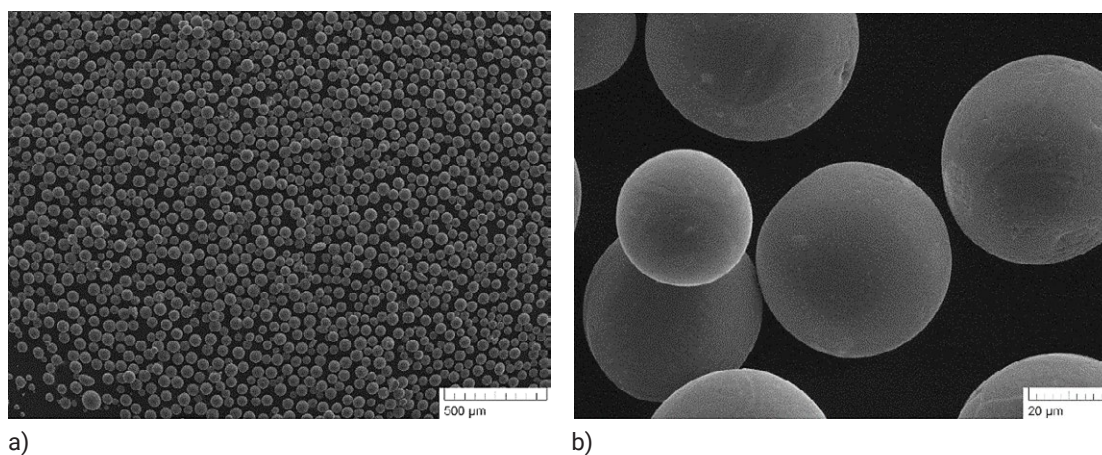


Fig. 2. SEM images of powder particles at different magnifications: a - x100, b - x2000

References:

1. M.A. Smirnov, M.A. Kaplan and M.A. Sevostyanov. Receiving finely divided metal powder by inert gas atomization // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 347 (2018) 012033 doi:10.1088/1757-899X/347/1/012033
2. Nasakina E. O., Baikin A. S., Sergiyenko K. V., Leonov A. V., Kaplan M. A., Seryogin A. V., Konushkin S. V., Myasnikova N. V., Sevostyanova M. A., Kolmakov A. G., Simakov S. V. Formation and Investigation of Composite Material Silver–Nitinol for Medical Purposes // Inorganic materials: applied research 2017 Vol. 8 No. 1 pp. 112–117
3. Sevost'yanov M.A., Nasakina E.O., Baikin A.S., Sergienko K.V., Konushkin S.V., Kaplan M.A., Seregin A.V., Leonov A.V., Kozlov V.A., Shkirin A.V., Bunkin N.F., Kolmakov A.G., Simakov S.V., Gudkov S.V. Biocompatibility of new materials based on nano-structured nitinol with titanium and tantalum composite surface layers: experimental analysis in vitro and in vivo // Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2018. Vol. 29. P.33
4. Kaplan M A, Sevost'yanov M A, Nasakina E O, Baikin A S, Sergienko K V, Konushkin S V, Kolmakov A G 2018 Influence of the Surface Modification on the Mechanical Properties of NiTi (55.8 wt % Ni) Alloy Wire for Medical Purposes Inorganic Materials: Applied Research 9 №4 pp 751–756

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ БИОПОВРЕЖДЕНИЙ И КЛЕЙКОСТИ ХЛОПКОВОГО ВОЛОКНА

Е.Л. Пехташева, Е.Е. Масталыгина, И.В. Лусинян, Н.А. Ибрагимова

ФГБОУ ВО РЭУ им. Г.В.Плеханова
e-mail: pekhtashevael@mail.ru

Выявлена взаимосвязь микробиологической деструкции и клейкости хлопкового волокна. «Медовая роса», находящаяся на волокне является крайне благоприятной средой для развития микроорганизмов.

Ключевые слова: показатель биодеструкции, клейкое хлопковое волокно, цветовая реакция, коэффициент деструкции, медовая роса

Хлопковое волокно – это уникальный вид текстильного сырья, не имеющее аналогов по своим свойствам. При достижении определенного уровня созревания хлопчатника, в хлопковом волокне образуется медовая роса, привнесенная насекомыми, питающимися флоэмой, и сахара, производимые самим растением. Эти сахара могут вызвать повышенную клейкость волокна, а также впоследствии могут влиять на степень биодеструкции.

А также при переработке хлопкового волокна с высоким показателем клейкости происходят сбои на технологическом оборудовании из-за налипания волокон на рабочие органы машин, частые остановки и повышенная обрывность пряжи.

Целью исследования являлось определение качества хлопкового волокна по показателю клейкости и показателю биодеструкции для своевременного обнаружения биозаражения волокна микроорганизмами.

Хлопок заражается микроорганизмами в процессе сборки, транспортировки и хранения. При машинном сборе хлопок-сырец сильно засоряется посторонними примесями. В него в большом количестве попадают частички листьев и коробочек с большей, чем волокно, влажностью. Такие посторонние частицы создают около себя влажную макрозону, в которой усиленно размножаются микроорганизмы. Благоприятным условием для разрушения хлопковых волокон микроорганизмами является влажность волокна выше 9%. Наличие сахаров может способствовать развитию микроорганизмов.

Для выявления взаимосвязи между клейкостью и стойкостью к воздействию микроорганизмов в динамике, было проанализировано 7 образцов хлопковых волокон разных сортов из Узбекистана, а также эталонный образец BREMER из Израиля. Испытания проводили согласно ГОСТ Р 53030-2008 «Волокно хлопковое. Методы определения клейкости и бактериально-грибкового заражения». Микроскопический метод исследования степени биодеструкции включает визуальную оценку состояния поверхности (степени деструкции) хлопкового волокна по классам А, В и С. Количественную оценку степени повреждения хлопкового волокна проводили по показателю деструкции К.

Оценка степени клейкости хлопкового волокна производилась по внешнему виду и количеству цветочных точек на бумаге для цветовой реакции по результатам испытания трех проб по наименьшему показателю. Данный метод отражен в проекте международного стандарта ISO/DIS 12027 «Материалы текстильные – Клейкость хлопкового волокна – Определение сахаров цветовой реакцией».

Как следует из полученных данных, практически все исходные образцы хлопковых волокон имели повреждения классов А, В и С. Однако у волокон с более высокой степенью клейкости количество повреждений каждого класса заметно больше, чем у хлопка-волокна низкой степени клейкости и без клейкости.

Выявлено, что коэффициент деструкции для клейких образцов (по истечении 6 недель) примерно в 2 раза выше, чем для неклейких.

Таким образом, в результате исследования степени биодеструкции в динамике и исходной клейкости хлопкового волокна доказано влияние наличия клейкости на такой показатель качества хлопкового волокна как биодеструкция.

STUDY OF THE RELATIONS BETWEEN BIODETERIORATION AND STICKINESS OF COTTON FIBER

E.L. Pekhtasheva, E.E. Mastalygina, I.V. Lusinyan, N.A. Ibragimova

Plekhanov Russian University of Economics

e-mail: pekhtashevael@mail.ru

There is connection which is revealed between microbiological destruction and adhesiveness of cotton fiber. Honeydew is very kind environment for microorganism breeding, when it is based on fiber.

Key words: biodegradation rate, adhesive cotton fiber, chromatic reaction, destruction rate, honeydew

Cotton fiber is a unique type of textile raw material that has no analogues in its properties. When a certain level of cotton ripening is reached, the honeydew appears on the cotton fiber, introduced by phloem insects and sugars produced by the plant itself. These sugars can cause increased stickiness of the fiber, and subsequently can affect the degree of biodegradation.

As well as in the processing of cotton fiber with a high stickiness index, there are failures on the process equipment due to sticking of the fibers on the working parts of the machines, frequent stops and increased breakage of the yarn.

The aim of this study was to determine the quality of cotton fiber in terms of stickiness and biodegradation indicators for the forehanded detection of biofouling with microorganisms.

Cotton becomes contaminated by microorganisms during picking, transportation and storage. At machine cotton-picking, raw cotton is heavily clogged with extraneous impurities. Particles of leaves and capsules with more moisture than fiber fall into it in large quantities. Such extra particles create around themselves a moist macrozone, in which microorganisms are vigorously reproducing. A favorable condition for the destruction of cotton fibers by microorganisms is the moisture content of the fibers above 9%. The presence of sugars can contribute to the microorganisms growth.

To identify the relations between adhesion and resistance to microorganisms in the dynamics, 7 samples of cotton fibers of different varieties from Uzbekistan, as well as the reference sample BREMER from Israel, were analyzed. The tests were carried out according to GOST R 53030-2008 "Cotton fiber. Methods for determining the stickiness and bacterial and fungal infection". The microscopic method of studying the biodegradation degree includes a visual assessment of the surface (destruction degree) of cotton fibers by three classes A, B and C. A quantitative assessment of the degree of damage to cotton fiber was carried out by the destruction index K.

The assessment of the degree of stickiness of cotton fiber was carried out by appearance and a number of color dots on paper for color reaction according to the results of testing three samples by the smallest indicator. This method is in the draft international standard ISO / DIS 12027 "Textile materials - Adhesiveness of cotton fiber - Determination of sugars by color reaction."

As follows from the obtained data, almost all the initial samples of cotton fibers had damages relating to the classes A, B and C. However, the fibers with a higher degree of stickiness had a greater amount of damages of each class, than for cotton with a low degree of stickiness and no stickiness.

It was revealed that the coefficient of destruction for sticky samples (after 6 weeks) is about 2 times higher than for non-sticky ones.

According to the result of the study of the degree of biodegradation in dynamics and initial stickiness of cotton fibers, the effect of stickiness on biodegradability of cotton fiber was proved.

УДК 577.352.335; 577.352.336

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ ЭПР СПИНОВЫХ ЗОНДОВ И РЕНТГЕНО-ДИФРАКЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРА NT-1505 НА СТРУКТУРУ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ

Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Кривандин А.В., Голощапов А.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля российской академии наук, Москва, Россия
119334, Россия, г.Москва, ул. Косыгина, 4
e-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Было изучено действие нейропротектора NT-1505 на структуру мембран синапсосом. Установлено значительное изменение структурных характеристик при введении препарата *in vivo*.

Ключевые слова: структура мембран, рентгено-дифракционный анализ, текучесть мембран, спиновый зонд, липид-белковые взаимодействия

На первом этапе методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов было исследовано изменение микровязкости синапсосомальных мембран в норме и при введении нейропротектора NT-1505 в дозе 10-4 моль/кг. В качестве показателя микровязкости использовалось время вращательной корреляции, рассчитанной из полученных спектров. Наблюдались динамические изменения микровязкости при белковых областях липидного бислоя с течением времени и в норме, и при введении препарата, в то же время изменения микровязкости в липидных областях мембран незначительны. Этот факт говорит о том, что основные изменения связаны с изменениями функциональности и активности мембранных белков и ферментов. Стоит отметить, что динамики изменений текучести при белковых областях мембран опытной и контрольной групп носят противоположный характер.

С целью более детального исследования структурного состояния мембран были изучены термоиндуцированные фазовые переходы липидного бислоя синапсосом. Для контрольной группы наблюдались два перехода в обеих областях мембран при температурах 289-293 К (16-20°C) и 311-317 К (38-44°C). Первый переход связывают с перестройками в липидной фазе, а второй - с изменениями структуры белков [1, 2]. При воздействии NT1505 оба перехода в при белковых областях мембраны наблюдаются при более низких температурах по отношению к контролю, 287-291 К (14-18°C) и 307-311 К (34-38°C) соответственно [3]. Этот факт, по-видимому, связан со встраиванием данного вещества в белковые структуры, в т.ч. рецепторы и каналы [4], что приводит к изменениям структуры мембранных белков и их липидного окружения. Липидная фаза мембран, свободная от белков, оставалась при этом практически не затронутой (не отличалась от контроля).

Кроме того, изменение структуры мембран было исследовано методом рентгено-дифракционного анализа. Для контрольной группы наблюдались два рефлекса, тогда как для опытной получалась крайне размытая дифракционная картина, можно было предположить о наличии двух очень слабоинтенсивных и уширенных пиков. Сравнивая полученные дифрактограммы, можно сделать вывод, что введение NT-1505 однозначно приводит к изменению в структуре мембран синапсосом, что проявляется в отчетливо видимом качественном различии получаемых дифрактограмм.

UDC 577.352.335; 577.352.336

THE STUDY BY ESR AND X-RAY DIFFRACTION ANALYSIS OF THE EFFECT OF THE NEUROPROTECTOR NT-1505 ON THE STRUCTURE OF THE SYNAPTOSOMAL MEMBRANES

Gerasimov N. Yu., Nevrova O.V., Krivandin A.V., Goloshchapov A.N.

Emanuel institute of biochemical physics RAS, Moscow, Russia
119334, Kosygina str., 4, Moscow, Russia
e-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

The effect of the neuroprotector NT-1505 on the structure of synaptosome membranes was studied. A significant changes in the structural characteristics after the drug injection *in vivo* were found.

Key words: membrane structure, x-ray diffraction analysis, membrane fluidity, spin probe, lipid-protein interactions

At the first stage, changes in the microviscosity of synaptosomal membranes in the norm and after the introduction of the neuroprotector NT-1505 at a dose of 10-4 mol/kg were studied by the electron paramagnetic resonance of spin probes. The rotational correlation time calculated from the obtained spectra was used as an indicator of microviscosity. Dynamic changes in microviscosity of the protein regions of the lipid bilayer of the control and experimental group over time was observed, at the same time, changes in microviscosity in the lipid regions of the membranes are insignificant. This fact suggests that the main changes are associated with changes in the functionality and activity of membrane proteins and enzymes. It should be noted that the dynamics of changes in the fluidity of the protein regions of the membranes of the experimental and control groups are opposite.

Thermoinduced phase transitions of the lipid bilayer by synaptosomes were studied in order to study the structural state of the membranes in more detail. For the control group, two transitions were observed in both membrane regions at temperatures of 289-293 K (16-20°C) and 311-317 K (38-44°C). The first transition is associated with rearrangements in the lipid phase, and the second - with changes in the structure of proteins [1, 2]. After the injection of the NT1505, both transitions in the protein regions of the membrane are observed at lower temperatures relative to the control, 287-291 K (14-18°C) and 307-311 K (34-38°C) respectively [3]. This fact seems to be associated with the incorporation of this substance into protein structures, including receptors and channels [4], which leads to changes in the structure of membrane proteins and their lipid environment. The lipid phase of the membranes, free from proteins, remained virtually unaffected (no different from the control).

In addition, membrane structure changes were investigated by x-ray diffraction analysis. Two reflexes was observed for the control group, whereas for the experimental group extremely diffuse diffraction pattern was observed, it was possible to assume the presence of two very low-intensity and broad peaks. Comparing the obtained diffractograms, it can be concluded that the introduction of NT-1505 assuredly leads to a change in the structure of synaptosome membranes, which is appeared in a clearly visible qualitative difference in the resulting diffractograms.

УДК 669: 675.043.82: 620.172.2: 620.187

МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА "НИКЕЛИД ТИТАНА – ТИТАН – ХИТОЗАН"

Сударчикова М.А., Насакина Е.О., Каплан М.А., Баскакова М.И., Царева А.М., Устинова Ю.Н., Севостьянов М.А., Колмаков А.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия
119334 РФ г. Москва, Ленинский пр-т, 49
e-mail.ru: bloodymaria@list.ru

Исследованы механические характеристики биосовместимого материала с градиентной структурой «никелид титана – титан – биodeградируемый полимерный слой» и компонентов. Формирование поверхностных слоев не оказывает существенного влияния на механические характеристики основы, наблюдается высокая адгезия слоев и основы друг к другу.

Ключевые слова: никелид титана, титан, хитозан, сверхэластичность, эффект памяти формы, композиционный материал, биосовместимость, биodeградируемый полимер

Изучены статические механические характеристики никелида титана и композитов на его основе с титановым и/или хитозановым поверхностными слоями.

В качестве основы композиционных материалов использовали проволоки никелида титана (55,91 масс. % Ni – 44,03 масс.% Ti) диаметром 280 мкм после последовательной шлифовки поверхности наждачной бумагой зернистостью до 1000 grit и алмазной пастой (6-1 мкм). Создание металлических композиционных материалов проводилось путем формирования поверхностных слоев из титана с помощью магнетрона на постоянном токе ~ 760 мА при напряжении ~ 400 В в газовой среде аргона при рабочем и

остаточном давлении $\sim 0,4$ и 4×10^{-4} Па, соответственно, в течение условного времени распыления 30 мин при дистанции напыления 150 мм после предварительного ионного травления, что приводило к формированию поверхностного титанового слоя толщиной $\sim 0,9$ мкм и переходного слоя $\sim 0,2$ мкм. Температура на поверхности подложек не превышала 150 °С. Полимерный поверхностный слой на никелиде титана и композите «никелид титана – титан» формировали на основе 3%-ого раствора хитозана высокомолекулярного и ортофосфорной кислоты. Металлические образцы после обезжиривания протаскивали через охлажденный раствор полимера, после чего на 5 мин погружали в фиксирующий раствор (гидроксид аммония – этиловый спирт 2:1). Проводили сушку при температуре 37 °С в течение 24 часов, отмывали в фиксирующем растворе для нейтрализации и удаления кислот и снова сушили. Толщина слоя составила менее 5 мкм.

Морфологию и послойный элементный состав (в т.ч с использованием поперечных шлифов) поверхности материалов исследовали на растровом электронном микроскопе (РЭМ) TESCAN VEGA II SBU, снабженном приставкой для энергодисперсионного анализа INCA Energy, на котором также проводили фрактографические исследования образцов, и электронном Оже-спектрометре JAMP-9500F фирмы JEOL в сочетании с ионным травлением при бомбардировке аргоном под углом 30°.

Механические свойства исследованных образцов определяли в условиях статического растяжения на механической 10 – тонной испытательной машине INSTRON 3382, со скоростью испытаний не более 2 мм/мин. На одну экспериментальную точку испытывали 5 образцов. Определяли значения предела текучести, предела прочности и относительного удлинения. Проводили циклические испытания.

Показано, что нанесение хитозана на металлическую основу не сказывается на ее прочности и пластичности в пределах погрешности измерений, не изменяет вид кривой «деформация–напряжение», тогда как формирование металлического поверхностного слоя методом магнетронного напыления незначительно уменьшает пластичность, увеличивает прочность и приводит к началу перехода аустенит-мартенсит при меньших нагрузках. По результатам циклических испытаний можно сделать вывод, что во всех образцах проявляется запаздывание и сверхупругость.

Отмечена высокая адгезия компонентов слоистого композиционного материала «никелид титана – титан – биodeградируемый полимерный слой (хитозан)» друг к другу и к основе.

Работа выполнена при поддержке гранта президента для молодых ученых (МК-4521.2018.8).

UDC 669: 675.043.82: 620.172.2: 620.187

MECHANICAL CHARACTERISTICS OF THE COMPOSITE MATERIAL "TITANIUM NICKELIDE - TITAN - CHITOSAN"

Sudarchikova M.A., Nasakina E.O., Kaplan M.A., Baskakova M.I., Tsareva A.M., Ustinova Yu.N., Sevostyanov M.A., Kolmakov A.G.

*Baikov Institute of Metallurgy and Material Sciences, Moscow, Russia
119334 Moscow, Leninsky Prospect, 49
e-mail.ru: bloodymaria@list.ru*

The mechanical characteristics of a biocompatible material with a gradient structure "nitinol – titanium – biodegradable polymer layer" and its components were investigated. The formation of the surface layers does not have a significant effect on the mechanical characteristics of the base, there is a high adhesion of the layers and the base to each other.

Key words: nitinol, titanium, chitosan, super elasticity, shape memory effect, composite material, biocompatibility, biodegradable polymer

The static mechanical characteristics of nitinol and composites based on it with titanium and / or chitosan surface layers were studied.

Nitinol wires (55.91 wt.% Ni – 44.03 wt.% Ti) with a diameter of 280 μm were used as the basis for composite materials after successive grinding of the surface with emery paper with a grain size of up to 1000 grit and diamond paste (6–1 μm). The creation of metal composite materials was carried out by forming titanium surface layers using a magnetron at a constant current of ~ 760 mA at a voltage of ~ 400 V in a gaseous argon atmosphere at a working and residual pressure of ~ 0.4 and 4×10^{-4} Pa, respectively, for a conditional time sputtering 30 min at a sputtering distance of 150 mm after preliminary ion etching, which led to the formation of a surface titanium layer ~ 0.9 μm thick and a transition layer ~ 0.2 μm . The temperature on the surface of the substrate did not exceed 150 °С. The polymer surface layer on nitinol and nitinol – titanium composite was formed on the basis of a 3%

high molecular weight chitosan and orthophosphoric acid solution. After degreasing, metal samples were dragged through a cooled polymer solution, after which they were immersed for 5 minutes in a fixing solution (ammonium hydroxide – ethyl alcohol 2: 1). Drying was carried out at a temperature of 37 °C for 24 hours, washed in a fixing solution to neutralize and remove acids, and dried again. The layer thickness was less than 5 microns.

The morphology and layered elemental composition (including using transverse thin sections) of the materials surfaces were studied using a TESCAN VEGA II SBU scanning electron microscope (SEM) equipped with an INCA Energy dispersive energy analyzer, which also carried out fractographic studies of the samples, and electronic Auger spectrometer JAMP-9500F company JEOL in combination with ion etching when bombarded with argon at an angle of 30 °.

The mechanical properties of the studied samples were determined under static tensile conditions on an INSTRON 3382 10-ton mechanical testing machine, with a test speed of no more than 2 mm/min. Five samples were tested per experimental point. The values of yield strength, tensile strength and relative elongation were determined. Cyclic tests were conducted/

It has been shown that the chitosan surface layer does not affect metal base strength and plasticity within the measurement error, does not change the shape of the deformation – stress curve, whereas the formation of a metal surface layer by the magnetron sputtering method slightly decreases plasticity, increases strength and leads to the beginning of the austenite-martensite transition at lower loads. According to the results of cyclic tests, it can be concluded that delay low and superelasticity appear in all samples.

High adhesion of the components of the layered composite material “nitinol - titanium - biodegradable polymer layer (chitosan)” to each other and to the base was noted.

This work was supported by a presidential grant for young scientists (МК-4521.2018.8).

УДК 664.2:613.22

МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ С ТЕРМОПЛАСТИЧНЫМ КРАХМАЛОМ ДЛЯ БИОРАЗЛАГАЕМОЙ УПАКОВОЧНОЙ ПЛЕНКИ

Лукин Н.Д.¹, Колпакова В.В.¹, Усачев И.С.¹, Сарджвеладзе А.С.¹, Соломин Д.А.¹, Васильев И.Ю.²

¹Всероссийский 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,

e-mail: vaneo20012@mail.ru.

²Московский политехнический университет, Россия, 127550, Москва, ул. Прянишникова, д. 2А,

e-mail: info@mgup.ru

Установлены закономерности влияния ультразвукового воздействия на физико-механические свойства композиций для биоразлагаемой пленки, изготовленных из полиэтилена низкой плотности и термопластичного крахмала при температуре 130–190°C. Определена температура для обеспечения наиболее эффективной прочности и относительного удлинения при разрыве.

Ключевые слова: термопластичный крахмал, биогибридная композиция, экструзия, биоразлагаемая полиэтиленовая пленка.

Во ВНИИ крахмалопродуктов проводятся исследования по разработке наполненных биоразлагаемых полимерных композиций для упаковочных материалов на основе нативного крахмала, подвергнутого экструзии [1]. Полимерные материалы (полиэтилен, полипропилен, поливинилхлорид) практически не подвергаются биодеструкции. Для придания материалам способности к биоразложению в окружающей среде используют наполнители природного происхождения: крахмал, целлюлозу, отходы пищевых производств и т. д. Для улучшения физико-механических показателей полимерных материалов при создании наполненных композиций применяется ультразвуковая обработка (УЗ) для равномерного распределения компонентов по объему [2]. Целью данной работы явилось определение влияния вибрационных УЗ воздействий на физико-механические свойства термопластичного крахмала (ТПК) при производстве биоразрушаемых полимерных изделий и прогнозирование на основе анализа структуры полимера с ТПК способности к биоразлагаемости.

На основе ТПК, изготовленным при различной температуре, путем смешивания гранул ТПК и ПЭНП при соотношении 70:30 получены биогибридные композиции (БГК). Исходный ТПК и БГК, приготовлен-

ные в виде жгутов, гранулировали на установке с узлом дробления и получали гранулы со размером около 2 мм. Обработку расплава полимера УЗ проводили непосредственно во время экструзии при помощи приставки, установленной между третьей и четвертой зоной экструзионной установки, между цилиндром и плоскощелевой головкой. Волновод УЗ приставки погружали непосредственно в расплав. На выходе из плоскощелевой головки получали расплав композиции БГК с полиэтиленом, после чего при помощи приемной установки, на которой расположены вращающиеся валы, расплавы приобретали вид готовой пленки. Образцы пленки наматывали в рулоны. Установлено, что у обработанных УЗ образцов показатель относительного удлинения повышался на 5-10 % при условии, если ТПК изготавливали при температуре в диапазоне от 130 до 170 °С. У пленки с ТПК, температура изготовления которого равнялась 190 °С, максимальная прочность была более низкая. Пленка с ТПК, который получали при температуре 170 °С, имела самую высокую максимальную прочность и относительное удлинение свыше 100%. Результаты с УЗ обработкой получены более стабильные.

В результате выполнены исследования, направленные на разработку технологии получения ТПК для биоразлагаемых полиэтиленовых изделий с применением ультразвукового воздействия на расплав полимерных композиций. Исследование влияния вибрационного УЗ воздействия на физико-механические свойства композиций для пленок, изготовленных из БГК при температуре 130–190 °С, показало, что пленки вырабатывались наиболее прочные, если их изготавливали из БГК при температуре 150–170 °С, а не 190 °С, как это наблюдалось ранее без ультразвуковой обработки расплава полиэтилена с пластификаторами. Установлено, что УЗ обработка расплава полиэтилена с ТПК вызывала деструкцию полимерной матрицы.

Литература:

1. Колпакова В.В., Усачев И.С., Сарджвеладзе А.С., Соломин Д.А., Ананьев В.В., Васильев И.Ю. Совершенствование технологии применения термопластичного крахмала для биоразлагаемой полимерной пленки // Пищевая промышленность. 2017. № 8. С. 34-38.
2. Кирш И.А., Чалых Т.И., Ананьев В.В., Заиков Г.Е. Модификация свойств биodeградируемых полимерных композиций при воздействии ультразвука на расплавы // Вестник Технологического университета. 2015. Т. 18. № 9. С. 74-77.

MODIFICATION OF POLYMER COMPOSITIONS WITH THERMOPLASTIC STARCH FOR BIO-DEPENDABLE PACKAGING PRODUCTS

Lukin N. D.¹, Kolpakova V.V.¹, Usachev I.S.¹, Sarjvelazhdze A.S.¹, Solomin D.A.¹, Vasilyev I.Yu.²

All-Russian Research Institute for starch products - a branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
11 Nekrasova St., Kraskovo, Moscow region, 140051, Russia,
e-mail: vniiik@arrisp.ru

The effects of ultrasonic exposure on the physicomechanical properties of compositions for a biodegradable film of low density polyethylene and thermoplastic starch at a temperature of 130-190 °C are determined. The temperature is determined to ensure the most effective strength and elongation at break.

Key words: thermoplastic starch, biohybrid composition, extrusion, biodegradable polyethylene film.

In the All-Russian Research Institute of starch products researches on development of the filled biodegradable polymeric compositions for packing materials on the basis of the native starch subjected to extrusion [1] are conducted. Polymeric materials (polyethylene, polypropylene, polyvinylchloride) are practically not exposed to biodestruction. For giving to materials of ability to biodegradation in the environment use fillers of natural origin: starch, cellulose, waste of food productions, etc. For improvement of physicomechanical indicators of polymeric materials during creation of the filled compositions ultrasonic processing (OUSE) is applied to uniform distribution of components on volume [2]. The purpose of this work was definition of influence of vibration BONDS of impacts on physicomechanical properties of thermoplastic starch (TPS) by production of the biodegraded polymeric products and forecasting on the basis of the analysis of structure of polymer with TPS of ability to biodegradability.

On the basis of TPS, made at different temperatures, by mixing granules of TPS and LDPE at a ratio of 70:30, biohybrid compositions (BHC) were obtained. The original TPS and BHC, prepared in the form of bundles, were granulated on a plant with a crushing unit and granules with a size of about 2 mm were obtained. Ultrasonic treatment of the polymer melt was carried out directly during extrusion with the aid of an attachment installed between the third and fourth zones of the extrusion unit, between the cylinder and the flat-slot head. Waveguide

ultrasound attachments immersed directly in the melt. At the exit from the slot head, a melt of a BHC composition with polyethylene was obtained, after which, using a receiving unit, on which rotating shafts are located, the melts acquired the appearance of a finished film. Samples of the film were wound into rolls. It was established that in the treated ultrasound specimens, the relative elongation index increased by 5-10%, provided that TPS was manufactured at a temperature in the range from 130 to 170 °C. The film with TPS, the manufacturing temperature of which was equal to 190 °C, the maximum strength was lower. A film with TPS, which was obtained at a temperature of 170 °C, had the highest maximum strength and elongation above 100%. Results with ultrasound treatment are more stable.

As a result, studies have been carried out aimed at developing a technology for producing TPS for biodegradable polyethylene products using ultrasonic effects on the melt of polymer compositions. The study of the effect of vibration ultrasound on the physicomachanical properties of compositions for films made of BHC at a temperature of 130–190 °C showed that the films were produced the most durable if they were made of BHC at a temperature of 150–170 °C, and not 190 °C. This was observed previously without ultrasonic treatment of the melt of polyethylene with plasticizers. It was found that the ultrasonic treatment of the melt of polyethylene with TPS caused the destruction of the polymer matrix.

References:

1. Kolpakova V.V., Usachev I.S., Sardzhveladze A.S., Solomin D.A., Anan'ev V.V., Vasil'ev I.YU. *Sovershenstvovanie tekhnologii primeneniya termoplastichnogo krahmala dlya biorazlagaemoj polimernoj plenki // Pishchevaya promyshlennost'. 2017. № 8. S. 34-38.*
2. Kirsh I.A., CHalyh T.I., Anan'ev V.V., Zaikov G.E. *Modifikaciya svojstv biodegradiruemih polimernih kompozicij pri vozdejstvii ul'trazvuka na rasplavy // Vestnik Tekhnologicheskogo universiteta. 2015. T. 18. № 9. S. 74-77.*

УДК: 631.445.41

НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ПОЧВЕ НАТРИЕВЫМИ СОЛЯМИ АМИНОКИСЛОТ

Аладин Д.Ю., Севостьянов С.М., Деева Н.Ф., Дёмин Д.В.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, РФ, 142290, Пущино, Институтская, 2,
e-mail: aladindanila@gmail.com

Получены результаты взаимодействия полихлорированных бифенилов с композицией натриевых солей аминокислот. Методом ИК-фурье спектроскопии показано, что происходит межмолекулярное взаимодействие, а также отщепление хлора в ароматическом кольце макромолекул ПХБ, что приводит к снижению концентраций ПХБ.

Ключевые слова: полихлорированные бифенилы, аминокислотная композиция

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) относятся к опасным стойким органическим веществам, обладают высокой устойчивостью в окружающей среде, при этом из 209 конгенов 11 являются токсичными и относятся к диоксиноподобным соединениям. Известно, что хлорорганические соединения взаимодействуют с производными первичных и вторичных аминов, в том числе с простыми и сложными аминокислотами. В качестве источника аминокислот использована композиция натриевых солей аминокислот, полученная щелочным гидролизом отходов кожевенного производства.

Изучено взаимодействие растворов ПХБ с натриевыми солями аминокислот методами ИК-спектроскопии и газо-жидкостной хроматографии в зависимости от концентрации компонентов и времени реакции. По данным ИК-спектроскопии выявлено межмолекулярное взаимодействие концентрированных растворов ПХБ с натриевыми солями аминокислот по водородным связям, гидроксильным, амидным и карбоксильным группам.

Получено, что при взаимодействии между молекулами ПХБ и натриевыми солями аминокислот происходят взаимодействия, в результате которых часть или все атомы хлора в ПХБ замещаются на радикалы -NH-CHR-COONa . Состав продуктов отвечает формуле $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{-nClIn-m(NH-CHR-COONa)}_m$, где n - число атомов хлора в исходной молекуле ПХБ, m - число -NH-CHR-COONa радикалов.

Продукты реакции - С-замещенные бифенилполиаминополиуксусные кислоты и их соли растворимы в воде и экстрагируются из частиц, на поверхности которых были адсорбированы полихлорированные бифенилы.

Продукты $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{-nClIn-m(NH-CHR-COONa)}_m$, как N-замещенные ароматические аминокислоты по

строению аналогичны полиароматическим аминокислотам, и могут служить питанием для почвенной микрофлоры. Таким образом натриевые соли аминокислот могут быть использована для восстановления загрязненных ПХБ почв.

Литература:

1. Юфит С.С. Яды вокруг нас. Вызов человечеству. М.: Классик Стиль. 2002. 366 с.
2. Фридман А.Я., Соколова Н.П., Полякова И.Я., Новиков В.К., Севастьянов С.М., Новиков А.К., Сорокин А.В. Перспективы использования белоксодержащих отходов в качестве возобновляемого сырья для производства экологически безопасной продукции // Экология и промышленность России. 8. 2008. С. 20-23.

UDC: 631.445.41

NEUTRALIZATION OF ORGANOCHLORINE COMPOUNDS IN THE SOIL WITH SODIUM SALTS OF AMINO ACIDS

Aladin D., Sevostyanov S., Deeva N., Demin D.

Institute of Basic Biological Problems RAS, Russian Federation, 142290, Pushchino, Institutskaya, 2
e-mail: aladindanila@gmail.com

The results of the interaction of polychlorinated biphenyls with the composition of sodium salts of amino acids are obtained. Using IR Fourier spectroscopy, it has been shown that intermolecular interactions occur and chlorine is removed in the aromatic ring of PCB macromolecules, which leads to a decrease in PCB concentrations.

Key words: polychlorinated biphenyls, amino acid composition

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are dangerous persistent organic substances, are highly resistant to the environment, while of the 209 congeners 11 are toxic and belong to dioxin-like compounds. It is known that organochlorine compounds interact with derivatives of primary and secondary amines, including simple and complex amino acids. The composition of the sodium salts of amino acids, obtained by alkaline hydrolysis of leather production, was used as a source of amycosylote.

The interaction of PCB solutions with sodium salts of amino acids was studied by IR spectroscopy and gas-liquid chromatography, depending on the concentration of components and the reaction time. According to IR spectroscopy, intermolecular interaction of concentrated PCB solutions with sodium salts of amino acids by hydrogen bonds, hydroxyl, amide, and carboxyl groups was revealed.

It was found that interactions between PCB molecules and sodium salts of amino acids occur interactions, as a result of which a part or all of the chlorine atoms in PCBs are replaced with the radicals -NH-CHR-COONa. The composition of the products corresponds to the formula $C_{12}H_{12-n}Cl_n-m(NH-CHR-COONa)_m$, where n is the number of chlorine atoms in the original PCB molecule, m is the number of -NH-CHR-COONa radicals.

The reaction products - C - substituted biphenyl polyamine polyacetic acids and their salts are soluble in water and extracted from particles, on the surface of which polychlorinated biphenyls were adsorbed.

$C_{12}H_{12-n}Cl_n-m(NH-CHR-COONa)_m$ products, as N-substituted aromatic amino acids, are similar in structure to polyaromatic amino acids, and can serve as nutrition for soil microflora. Thus, sodium salts of amino acids may be used for sanation of PCB contaminated soils.

References:

1. Yufit S.S. Poisons around us. Challenge humanity. M.: Classic Style. 2002. 366 p.
2. Fridman A.Ya., Sokolova N.P., Polyakova I.Ya., Novikov V.K., Sevostyanov S.M., Novikov A.K., Sorokin A.V. Prospects for the use of protein-containing waste as a renewable raw material for the production of environmentally safe products // Ecology and Industry of Russia. 8. 2008. p. 20-23.

НОВЫЕ НАНОРАЗМЕРНЫЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Штильман М.И.¹, Кусков А.Н.¹, Куликов П.П.¹, Лусс А.Л.¹, Джеджея В.Т.¹, Гусев С.А.², Gurevich L.³, Nelemans L.C.³, Christiansen G.³, Tsatsakis A.M.⁴

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Кафедра биоматериалов, Москва, Россия

e-mail: shtilmanm@yandex.ru

²Clinical Center for Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

³Aalborg University, Aalborg, Denmark

⁴University of Crete, Medical School, Division Morphology, Greece

Разработаны амфифильные производные ряда водорастворимых полимеров, в частности, поли-N-винилпирролидона. В опытах на клетках и опытных животных показана безвредность полученных полимеров. Синтезированные амфифильные полимеры способны к спонтанной агрегации в водных растворах с образованием наноразмерных мицеллоподобных агрегатов и пригодны для модификации липосомальных мембран. Такие системы могут быть использованы в качестве носителей плохо растворимых и нерастворимых в воде лекарственных веществ [3,4].

С другой стороны, агрегаты амфифильных полимеров N-винилпирролидона оказались пригодными для использования в качестве носителей различных белков и пептидов (фактор крови IX, ангиостатин, ингибитор соевой протеиназы Bowman-Birk (BBI)). В этом случае иммобилизация с использованием полимерных агрегатов повышает устойчивость белков к денатурирующим эффектам и, следовательно, их общую биологическую активность. Введение дополнительных боковых аминогрупп в полимерную часть амфифильных систем позволяет использовать агрегаты в качестве носителей нуклеиновых кислот и их последующее применение для трансфекции в генной инженерии [5,6].

Используя флуоресцентные метки и зонды, было показано, что иммобилизованное вещество, введенное в крупные агрегаты, проникает в живую клетку благодаря эндоцитозу, локализуясь в цитоплазме внутри эндосомы. С другой стороны, когда иммобилизованный активный агент вводится в агрегаты меньшего размера, он равномерно распространяется как в цитоплазме клетки, так и в ее ядре. При изучении транспорта агрегатов амфифильных полимеров N-винилпирролидона в организме (крысы) было установлено, что флуоресцентный зонд, иммобилизованный в агрегатах амфифильных полимеров, при введении в хвост экспериментальных животных быстро достигает сосудов глаза [7-11].

Литература:

1. V.P.Torchilin, M.I.Shtilman, V.S.Trubetskoy, K Whiteman., *Biochimica et BiophysicaActa. Biomembranes* N.1195, 181-184 (1994).
2. V.P.Torchilin, T.S.Levchenko, K.R.Whiteman, A.A.Yaroslavov, Tsatsakis, A.M., A.K.Rizos, E.V.Michailova, M.I. Shtilman *Biomaterials*. 22, 3035-3044 (2001).
3. A.N.Kuskov, P.P.Kulikov, A.V.Goryachaya, M. Tzatzarakis, A.O.Docea, K.Velonia, M.I.Shtilman, A.M.Tsatsakis *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13, 1021-1030 (2017).
4. A.N.Kuskov, P.P.Kulikov, A.V.Goryachaya, M.N.Tsatzarakis, A.M.Tsatsakis, K.Velonia, M.I.Shtilman *J.of Applied Polymer Science* 135, 45673 (2018).
5. C.L.Andersen, S.B.Romme, P.Fojan, C.P.Pennisi, A.L.Luss, P.P.Kulikov, L.Gurevich, M.I. Shtilman *Biophysical J.* B511, 590 (2017).
6. A.L.Villemson, A.N.Kuskov, M.I.,Shtilman, L.V.Galebskaya, E.V.Ryumina, N.I. Larionova. *Biochemistry (Moscow)* 69, 765-775 (2004).
7. O.Klimenko, M.Shtilman *Cancer Gene Therapy* 20, 237-241 (2013).
8. O.Klimenko, M.Shtilman *Food and Chem.Toxicol.*, (2019) (in press).
9. A.L.Luss, C.L.Andersen, I.G.Benito, R.C.Marzo, Z.H.Medina, M.B.Rosenlund, S.B.Romme, P.P.Kulikov, C.P.Pennisi, M.I.Shtilman, L.Gurevich *Biophysical J.* 114, 278-279 (2018).
10. A.L.Luss, P.P.Kulikov, S.B.Romme, C.L.Andersen, C.P.Pennisi, A.O.Docea, A.N.Kuskov, K.Velonia, Ya.O.Mezhuev, M.I.Shtilman, A.M.Tsatsakis, L.Gurevich *Nanosized carriers based on amphiphilic poly-N-vinyl-2-pyrrolidone for intranuclear drug delivery. Nanomedicine*, 13, 703-715 (2018).
11. M.Tawfik, M.Sokolov, L.Grigartzik, P. Kulikov, A. Kuskov, M. Shtilman, B.A.Sabel, P.Henrich-Noack *Bionanotex (Crete, Greece)*, P02 (2018).

NEW NANOSIZED MACRO MOLECULAR SYSTEMS FOR MEDICAL BIOTECHNOLOGY

Shtilman M.I.¹, Kuskov A.N.¹, Kulikov P.P.¹, Luss A.L.¹, Jedzheya V.T.¹, Gusev S.A.², Gurevich L.³, Nelemans L.C.³, Christiansen G.³, Tsatsakis A.M.⁴

¹D.I.Mendeleyev University of Chemical Technology of Russian, Department of Biomaterials. Moscow, Russia.

e-mail shtilmanm@yandex.ru

²Clinical Center for Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

³Aalborg University, Aalborg, Denmark

⁴University of Crete, Medical School, Division Morphology, Greece

Amphiphilic derivatives of a number of water-soluble polymers, in particular, poly-N-vinyl pyrrolidone, have been developed. In experiments on cages and experimental animals, the harmlessness of the polymers obtained was shown.

The synthesized amphiphilic polymers are capable of spontaneous aggregation in aqueous solutions with the formation of nanoscale micelle-like aggregates and are suitable for modifying liposomal membranes. Such systems can be used as carriers of poorly soluble and water-insoluble medicinal substances [3,4].

On the other hand, aggregates of amphiphilic polymers of N-vinylpyrrolidone proved to be suitable for use as carriers of various proteins and peptides (blood factor IX, angiostatin, Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor (BBI)). In this case, immobilization with the use of polymeric aggregates increases the resistance of proteins to denaturing effects, and thereof their total biological activity. Introduction of additional side amino groups in the polymeric part of amphiphilic systems allows the use of aggregates as carriers of nucleic acids and their subsequent application for transfection in genetic engineering [5,6].

Using fluorescent labels and probes, it was shown that the immobilized substance introduced into largesize aggregates penetrates into the living cell due to endocytosis, localizing in the cytoplasm inside the endosome. On the other hand, when immobilized active agent is introduced in smaller-sized aggregates, it evenly spreads both in the cytoplasm of the cell and in its nucleus. When studying the transport of aggregates of amphiphilic polymers of N-vinylpyrrolidone in the body (rats), it was established that a fluorescent probe immobilized in aggregates of amphiphilic polymers, when injected into the tail of experimental animals, quickly reaches the vessels of the eye [7-9].

References:

1. V.P.Torchilin, M.I.Shtilman, V.S.Trubetskoy, K Whiteman., *Biochimica et BiophysicaActa. Biomembranes* N.1195, 181-184 (1994).
2. V.P.Torchilin, T.S.Levchenko, K.R.Whiteman, A.A.Yaroslavov, Tsatsakis, A.M., A.K.Rizos, E.V.Michailova, M.I. Shtilman *Biomaterials*. 22, 3035-3044 (2001).
3. A.N.Kuskov, P.P.Kulikov, A.V.Goryachaya, M.Tzatzarakis, A.O.Docea, K.Velonia, M.I.Shtilman, A.M.Tsatsakis *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13, 1021-1030 (2017).
4. A.N.Kuskov, P.P.Kulikov, A.V.Goryachaya, M.N.Tsatzarakis, A.M.Tsatsakis, K.Velonia, M.I.Shtilman *J.of Applied Polymer Science* 135, 45673 (2018).
5. C.L.Andersen, S.B.Romme, P.Fojan, C.P.Pennisi, A.L.Luss, P.P.Kulikov, L.Gurevich, M.I. Shtilman *Biophysical J.* B511, 590 (2017).
6. A.L.Villemson, A.N.Kuskov, M.I., Shtilman, L.V.Galebskaya, E.V.Ryumina, N.I. Larionova. *Biochemistry (Moscow)* 69, 765-775 (2004).
7. O.Klimenko, M.Shtilman *Cancer Gene Therapy* 20, 237-241 (2013).
8. O.Klimenko, M.Shtilman *Food and Chem.Toxicol.*, (2019) (in press).
9. A.L.Luss, C.L.Andersen, I.G.Benito, R.C.Marzo, Z.H.Medina, M.B.Rosenlund, S.B.Romme, P.P.Kulikov, C.P.Pennisi, M.I.Shtilman, L.Gurevich *Biophysical J.* 114, 278-279 (2018).
10. A.L.Luss, P.P.Kulikov, S.B.Romme, C.L.Andersen, C.P.Pennisi, A.O.Docea, A.N.Kuskov, K.Velonia, Ya.O.Mezhnev, M.I.Shtilman, A.M.Tsatsakis, L.Gurevich *Nanosized carriers based on amphiphilic poly-N-vinyl-2-pyrrolidone for intranuclear drug delivery. Nanomedicine*, 13, 703-715 (2018).
11. M.Tawfik, M.Sokolov, L.Grigartzik, P. Kulikov, A. Kuskov, M. Shtilman, B.A.Sabel, P.Henrich-Noack *Bionanotox (Crete, Greece)*, P02 (2018).

УДК 57.049

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ГИДРОМОДУЛЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ ПОСУДЫ НА ОСНОВЕ ОТХОДОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Павловская Н.Е., Горькова И.В., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Гуляева К.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», г.Орел, Россия
302019, г.Орел, ул.Генерала Родина, д.69
e-mail: i-gagarina@list.ru

Годовое производство синтетических полимеров (пластмасс), большинство из которых произведено на основе нефтехимии, превышает 300 млн тонн в год. По оценкам экспертов, к 2020 г производство пластмасс возрастет до 400 млн тонн в год. Полученные образцы посуды пригодны для применения, безопасны, экономически выгодны и быстро разрушаются в окружающей среде

Ключевые слова: биоразлагаемая посуда, съедобная посуда, отходы производства, гидромодуль

Существует сотни различных пластмасс, используемых в строительстве, быту и медицине. Большинство из них недолговечно и попадает на полигоны, в океан, распадаясь на мелкие частицы, попадают в живые организмы, убивая их. Срок разложения пластика составляет 450 лет. Единственной альтернативой ему является биоразлагаемый пластик, производство которого в настоящее время составляет, по разным оценкам, от 3 до 5% от производимого пластика.

Материалом для производства биodeградируемого материала служат: крахмал, целлюлоза, РНА (полигидроксисмалканоаты), PLA (полимолочная кислота или полилактид), ААС (терефталевая кислота, адипиновая кислота и бутандиол), PCL (поликапролактон) и др. Основными производителями биопластика и биопластмассы являются страны Азии. Отечественное производство только начинает развиваться. Несомненным преимуществом для производства экологически чистого материала служит биомасса растений, ежегодно воспроизводимая в природе и не содержащая токсичных компонентов.

Целью наших исследований является создание биопластика для производства съедобной посуды на основе растительного крахмала и отхода сахарного производства – жома сахарной свеклы.

Подобрана композиция гидромодуля с физико-химической характеристикой, соответствующей стандарту. Плотность образцов составила 1,17-1,15 г/см³, прочность при растяжении в продольном направлении от 18 до 23 МПа, прочность в поперечном направлении – от 14 до 17 МПа и относительное удлинение при разрыве составляет от 5 до 7%, что свидетельствует о возможности применения материала для упаковки продуктов в качестве пленок и изготовлению посуды одноразового пользования. Лабораторные образцы биополимеров выдерживают температуру окружающей среды до 60С, влажность 75%, при эксплуатации изделий не допустим контакт со щелочами, кислотами. Умеренная восприимчивость материала к маслам и воде. Разрушение материала начинается при попадании в среду с природными микроорганизмами и продолжается 45 дней.

UDC 57.049

OPTIMIZATION OF THE COMPOSITION OF A HYDROMODULE TO CREATE A BIOGRAPHABLE PLANT ON THE BASIS OF AGRICULTURAL PRODUCTION WASTE

Pavlovskaya N.E., Gor'kova I.V., Gagarina I.N., Gavrilova A.Yu., Gulyaeva K.N.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Oryol State Agrarian University named after N.V. Parakhina», Orel, Russia
302019, Orel, Generala Rodina St., 69
e-mail: i-gagarina@list.ru

Annual production of synthetic polymers (plastics), most of which are based on petrochemicals, exceeds 300

million tons per year. According to experts, by 2020 the production of plastics will increase to 400 million tons per year. The obtained samples of dishes suitable for use, safe, cost-effective and quickly destroyed in the environment

Key words: biodegradable utensils, edible utensils, production wastes, hydraulic module.

There are hundreds of different plastics used in construction, household and medicine. Most of them are short-lived and fall into landfills, into the ocean, breaking up into small particles, get into living organisms, killing them. The term decomposition of plastic is 450 years. The only alternative to it is biodegradable plastic, the production of which at present is, according to various estimates, from 3 to 5% of the produced plastic.

Materials used for the production of biodegradable material are: starch, cellulose, PHA (polyhydroxyalkanoates), PLA (polylactic acid or polylactide), AAC (terephthalic acid, adipic acid and butanediol), PCL (polycaprolactone), etc. The main producers of bioplastic and bioplastics and bioplast materials. Domestic production is just beginning to develop. The undoubted advantage for the production of environmentally friendly material is the plant biomass, which is annually reproducible in nature and does not contain toxic components.

The aim of our research is to create a bioplastic for the production of edible utensils based on vegetable starch and sugar production waste - sugar beet pulp.

The selected composition of the hydronic module with a physico-chemical characteristic that meets the standard. The density of the samples was 1.17-1.15 g / cm³, the tensile strength in the longitudinal direction from 18 to 23 MPa, the strength in the transverse direction, from 14 to 17 MPa and the relative elongation at break is from 5 to 7%, which indicates the possibility of using the material for packaging products as films and the manufacture of disposable tableware. Laboratory samples of biopolymers withstand ambient temperatures of up to 60 °C, humidity 75%, while using products we will not allow contact with alkalis and acids. Moderate material susceptibility to oil and water. The destruction of the material begins when released into the environment with natural microorganisms and lasts 45 days.

УДК 543.94

ОПТИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА, КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И БИОМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Веселова И.А., Еремина О.Е., Македонская М.И., Барсукова М.Е., Гудилин Е.А., Шеховцова Т.Н.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Ленинские горы, 1-3, ГСП-2, 199991, Москва, РФ
e-mail: irina.veselova@mail.ru

Ключевые слова: оптические сенсорные системы, экологический мониторинг, контроль качества растительного сырья, биомедицинская диагностика, флуоресценция, гигантское комбинационное рассеяние

В докладе будут обсуждены универсальные нанокompозитные пленочные покрытия на основе гибридных материалов: неорганических наноструктур серебра и полимерных структур (природных полимеров: хитозана, коллагена, альгината кальция) в качестве основы твердофазных сенсорных элементов, адаптированных под серийно выпускаемое оптическое оборудование, функционирующих в матрицах сложного (в том числе неизвестного) состава различной полярности. На основе разработанных сенсорных элементов созданы методики для высокочувствительного, селективного и экспрессного мультиплексного определения различными методами оптической спектроскопии (флуоресценции и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР)) актуальных маркеров: (1) идентификаторов техногенного загрязнения среды (полиароматических углеводородов, полихлорированных бифенилов, диоксинов и фенольных соединений); (2) маркеров ряда социально-значимых заболеваний – катехоламинов, пероксидов, а также маркеров антиоксидантной активности растительного сырья – флавоноидов. С учетом высоко конкурентных исследований, проводящихся в данном направлении в мире, и междисциплинарности необходимых подходов в докладе будут охвачены как фундаментальное изучение процессов и установление конкретных механизмов сорбции и «распознавания», реализующихся на микропористых полимерных поверхностях, так и прикладные аспекты создания сенсорных элементов, адаптированных под серийно выпускаемое оборудование, и разработку методик для экспресс-мониторинга техногенных объектов, объектов окружающей среды и биологических систем без предварительной (или минимальной)

подготовки проб к анализу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Гранты № 17-53-50025 и 19-03-00901).

UDK 543.94

SOLID-STATE OPTICAL SENSOR SYSTEMS FOR MEDICAL DIAGNOSTICS, QUALITY CONTROL OF RAW PLANT MATERIAL, AND ENVIRONMENTAL MONITORING

Veselova I.A., Eremina O.E., Makedonskaya M.I., Barsukova M.E., Goodilin E.A., Shekhovtsova T.N.

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of chemistry,
Leninskie Gory, 1-3, GSP-2, 199991, Moscow, Russian Federation
e-mail: irina.veselova@mail.ru*

Key words: optical sensor systems, environmental monitoring, quality control of raw plant materials, biomedical diagnostics, fluorescence, SERS

In the proposed report we are going to discuss universal nanocomposite film coatings based on hybrid materials – inorganic nanostructures (nanoparticles of silver) and polymer structures (using natural polymers such as chitosan, collagen, and calcium alginate) – as basis for solid-state sensors, which are adapted for standard equipment and will work in matrices with complex (including unknown) composition with different polarities without prior sample preparation for medical diagnostics and environmental monitoring. Moreover, innovative techniques for highly sensitive, selective, rapid and multiplex determination – based on the newly developed sensors – of main topical markers: (1) the identifiers of man-made pollution (polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, dioxins and phenolic compounds); (2) markers/initiators of oxidative stress in organism (redox-active molecules such as catecholamines, peroxides, flavonoids). In order to solve this up-to-date problems, different methods of optical spectroscopy: surface enhanced Raman scattering (SERS), enhanced on the surface fluorescence and absorption spectroscopy – will be applied. The area of this problem is extremely wide due to the highly competitive studies carried out in this field in the world and including interdisciplinarity of research work as it globally covers fundamental research of the processes and establishment of concrete sorption and “recognition” mechanisms that are taking place on microporous polymer surface. In addition, creation of sensors (adopted for standard equipment) and development of techniques for express – diagnostics are highly demanded in analysis of both environmental objects and biological systems without (or with minimal) prior sample preparation.

We are grateful to RFBR for the financial support of this research (grants no. 17-53-50025, 19-03-00901).

УДК: 577.114; 577.22

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАН-ПЕКТИНОВЫХ МИКРОЧАСТИЦ, НАГРУЖЕННЫХ ДОКСОРУБИЦИНОМ

Ковалева Д.И., Красноштанова А.А.

*Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20.
e-mail: aak28@yandex.ru*

Подобраны условия получения хитозан-пектиновых микрочастиц в качестве систем адресной доставки лекарств. На примере доксорубина показана возможность включения лекарственного средства в хитозан-пектиновые микрочастицы и его селективное высвобождение в зависимости от кислотности среды.

Ключевые слова: хитозан, пектин, доксорубин, адресная доставка лекарств.

Проблема адресной доставки лекарственных средств является одной из ключевых для современной биотехнологии и биомедицинской химии. Из всех возможных способов введения лекарственных средств наиболее удобным является пероральный. Однако его применение сдерживается нестабильностью лекарственных средств в среде желудочно-кишечного тракта [1]. В то же время сами лекарственные

средства могут оказывать ингибирующее действие на пищеварительные ферменты. С целью достижения целенаправленного пролонгированного высвобождения лекарственного средства применяют системы адресной доставки на основе природных полисахаридов, в частности хитозана и пектина [2]. Достоинствами данных биополимеров являются их мукоадгезивные свойства, биodeградируемость и низкая токсичность. Хитозан в составе микрокапсул, как правило, играет роль матрицы, а пектин – защитного покрытия [3].

Целью работы явился подбор условий получения хитозан-пектиновых микрочастиц, нагруженных доксорубицином в качестве системы пероральной доставки лекарств.

В качестве объектов исследования был использован хитозан с молекулярной массой 200 кДа и степенью деацетилирования 85% и яблочный пектин с молекулярной массой 12 кДа и степенью метаксиллирования 66%. В ходе проведенных исследований было установлено, что при мольном соотношении пектин:хитозан размер частиц составляет 600-900 нм, что является оптимальным для перорального способа доставки [4]. Значение дзета-потенциала полученных микрочастиц составило 34-40 мВ, что позволяет сделать вывод об отсутствии агрегации микрочастиц. Было установлено, что увеличение исходной концентрации хитозана в растворе с 0,017% до 0,2% и пектина с 0,01% до 0,1% не приводит к увеличению размера и снижению дзета-потенциала получаемых частиц, однако в этом случае увеличивается выход микрочастиц.

Полученные хитозан-пектиновые микрочастицы были апробированы в качестве системы адресной доставки лекарственных средств на примере доксорубина. Была установлена доза включения доксорубина в хитозан-пектиновые микрочастицы, которая составила 12 мг/г микрочастиц. Изучение параллельного профиля высвобождения доксорубина показало, что наибольший выход лекарственного средства наблюдается при значении pH среды 6,0-7,2, что соответствует среде тонкого кишечника. Степень высвобождения доксорубина при pH 1,2 (что соответствует среде желудка) не превышает 20-25%. Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что комплекс хитозан-пектин является перспективным носителем для разработки систем адресной доставки лекарств.

Литература:

1. М.В. Коновалова, А.В. Ильина, Д.В. Курек, В.П. Варламов. Получение, свойства и перспективы применения частиц на основе хитозана и пектина // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2015.- № 4(1) – с. 68-70.
2. Morris G., Kök S., Harding S., Adams G. Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2010. V. 27. P. 257–284.
3. Munarin F., Tanzi M.C., Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels // Int. J. Biol. Macromol. 2012. V. 51 (4). P. 681–689.
4. Журавлева Н.Н., Красноштанова А.А. Разработка системы пероральной доставки инсулина на основе хитозан-альгинатных наночастиц //Биофармацевтический журнал. –2018. – т.10. – № 5. – P. 15-20.

UDC: 577.114; 577.22

OBTAINING CHITOSAN-PECTIN MICROPARTICLES LOADED WITH DOXORUBICIN

Kovaleva D.I., Krasnoshtanova A.A.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia
125480, Moscow, st. Geroev Panfilovtsev, 20.
e-mail: aak28@yandex.ru

The conditions for obtaining chitosan-pectin microparticles as systems for targeted drug delivery were selected. Using doxorubicine as an example, the possibility of including the drug in chitosan-pectin microparticles and its selective release depending on the acidity of the environment is shown.

Key words: chitosan, pectin, doxorubicin, targeted drug delivery.

The problem of targeted drug delivery is one of the key for modern biotechnology and biomedical chemistry. The oral method is the most convenient method of all the possible methods for targeted delivery of drugs. However, its use is hampered by the instability of drugs in the environment of the gastrointestinal tract [1]. At the same time, the drugs themselves may have an inhibitory effect on the digestive enzymes. In order to achieve a targeted, prolonged release of the drug, using targeted delivery systems are based on natural polysaccharides, in particular, chitosan and pectin [2]. The advantages of these biopolymers are their mucoadhesive properties, biodegradability and low toxicity. Chitosan in the composition of microcapsules, as a rule, plays the role of a matrix, and pectin - a

protective coating [3].

The purpose of this investigation is to select the conditions for obtaining chitosan-pectin microparticles loaded with doxorubicin as an oral drug delivery system.

Chitosan with a molecular mass of 200 kDa and a degree of deacetylation of 85% and apple pectin with a molecular mass of 12 kDa and a degree of methylation of 66% were used as objects of study. In the course of the research it was found that at a molar ratio of pectin: chitosan 1:2, the particle size is 600-900 nm, which is optimal for oral delivery [4]. The value of the ζ -potential of the obtained microparticles was 35-40 mV, which allows to conclude that there is no aggregation of the microparticles. It was found that an increase in the initial concentration of chitosan in the solution from 0.017% to 0.2% and pectin from 0.01% to 0.1% does not lead to an increase in size and a decrease in the ζ -potential of the particles produced, but in this case the yield of microparticles increases.

The obtained chitosan-pectin microparticles were tested as targeted drug delivery, for example, doxorubicin. The level of inclusion of doxorubicin in chitosan-pectin microparticles was installed. Its value was 12 mg/g of microparticles. The investigation of the parallel release profile of doxorubicin showed that the highest yield of the drug is observed at a pH of 6.0-7.2, which corresponds to the environment of the small intestine. The degree of release of doxorubicin at pH 1.2 (which corresponds to the environment of the stomach) does not exceed 20-25%.

Thus, the conducted studies suggest that the chitosan-pectin complex is a promising carrier for the development of targeted drug delivery systems.

References:

1. M.V. Konovalova, A.V. Ilina, D.V. Kurek, V.P. Varlamov. Production, properties and prospects of using particles based on chitosan and pectin // News of the Ufa Research Center of the Russian Academy of Sciences. - 2015. - № 4 (1) - p. 68-70.
2. Morris G., K  k S., Harding S., Adams G. Polysaccharide and chitosan // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2010. V. 27. P. 257-284.
3. Munarin F., Tanzi M.C., Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels // Int. J. Biol. Macromol. 2012. V. 51 (4). P. 681-689.
4. Zhuravleva N.N., Krasnoshtanova A.A. Development of an oral insulin delivery system based on chitosan-alginate nanoparticles // Biopharmaceutical journal. -2018. - vol.10. - № 5. - P. 15-20.

УДК 602.4:628.35:664

РАЗРАБОТКА МЕДИАТОРНОГО БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ *PARACOCCLUS YEEI* ВКМ В-3302

А.С.Харькова, С.В.Алферов, В.А.Арляпов

Тульский государственный университет
e-mail: Anyuta_Zaytseva@mail.ru

Найдены константы скорости взаимодействия медиатора с бактериями *Paracoccus yeei* и константы гетерогенного переноса электронов, на основе которых был разработан биосенсор для экспресс-определения БПК₅.

Ключевые слова: БПК; биосенсор; медиатор; бактерии *Paracoccus yeei*

Последнее десятилетие отмечено интенсивным изучением аналитических возможностей и практическим применением биосенсорных систем [1-3]. Экспресс-оценка загрязнения объектов окружающей среды, в частности, определение органических примесей в поверхностных, грунтовых и сточных водах, является актуальной задачей. Целью данной работы явилось использование бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, выделенных из активного ила, для создания медиаторного БПК-биосенсора.

В качестве микроорганизмов были использованы бактерии *P. yeei*, так как активный ил является инкулятом в стандартном методе анализа, то индивидуальные микроорганизмы выделенные из него будут обеспечивать правильность результатов анализа и корреляцию с результатами стандартного метода анализа. В качестве медиаторов были выбраны ферроцен и его производные, а также производные феназина (нейтральный красный, тионин, метиленовый синий). Данные вещества находят широкое применение в качестве переносчиков электронов от активного центра ферментов клеток к поверхности электрода.

Методом циклической вольтамперометрии с помощью анализатора «Экотест-ВА» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия) были исследованы электрохимические свойства используемых медиаторов.

В результате выявления лимитирующих стадий были использованы модели Николсона [4] и Лавирона [5] для расчета гетерогенный констант скорости переноса электронов. Методом циклической вольтамерометрии с использованием модели Николсона и Шайна [6] были найдены константы взаимодействия медиаторов с бактериями *P. yeii*. На основе полученных данных было установлено что наиболее эффективный медиатор для исследуемых микроорганизмов – ферроцен (константа взаимодействия - $0,013 \pm 0,003 \text{ дм}^3/(\text{моль} \cdot \text{с})$, константа гетерогенного переноса электронов – $0,4 \pm 0,1 \text{ см}^2/\text{с}$).

На основе системы «бактерии *P. yeii* – ферроцен – угольно-пастовый электрод» был сформирован медиаторный биосенсор. Было установлено, что биосенсор позволяет определять индекс биохимического потребления кислорода (БПК₅) в диапазоне 1,3 – 200 мгО₂/дм³. Длительность единичного измерения не превышает 6 мин, рецепторная система характеризуется стабильной работой на протяжении 22 дней. По чувствительности разработанный биосенсор не уступает известным аналогам.

Был проведен анализ проб воды различного происхождения (болотная, речная вода) стандартным методом и с использованием разработанного биосенсора. Статистическая обработка результатов показала, что данные, полученные обоими методами, незначимо отличаются. Разработанный биосенсор можно использовать в качестве альтернативы стандартному анализу.

В результате электрохимических исследований системы «*P. yeii* – медитатор – угольно-пастовый электрод» был выявлен наиболее эффективный медиатор – ферроцен (константа взаимодействия - $0,013 \pm 0,003 \text{ дм}^3/(\text{моль} \cdot \text{с})$, константа гетерогенного переноса электронов – $0,4 \pm 0,1 \text{ см}^2/\text{с}$) для формирования биосенсора. Установлено, что по чувствительности (нижняя граница определяемых концентраций 1,3 мгО₂/дм³) определения биохимического потребления кислорода разработанный биосенсор не уступает известным аналогам. Апробация биосенсора на десяти образцах воды различного происхождения показала, что разработанный биосенсор можно использовать в качестве альтернативы стандартному анализу.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-74-10078).

Литература:

1. Hu J., Gao G., Xia S. A Mediated BOD Microsensor Based on Poly (Neutral Red) and Bacteria Modified Interdigitated Ultramicroelectrode Array // *International journal of electrochemical science*. 2016. V. 11. I. 7. P. 6387-6402.
2. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue / Niyomdech S. Limbut W., Numnuam A. et al. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017. V. 241. P. 473-481.
3. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium / G. Gao, J. Qiana, D. Fang et al. // *Analytica chimica acta*. 2016. V. 924. P. 21-28.
4. Ribau I., Fortunato E. A Simple Procedure to Fabricate Paper Biosensor and Its Applicability—NADH/NAD⁺ Redox System // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018. V. 6. PP. 175-187. Nicholson
5. Bravo I., Revenga-Parra M., Weber K., Popp J., Pariente F., Lorenzo E. One-step reduced/quinone functionalized graphene oxide as reagentless lactate biosensing platform // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018. V. 267. P. 533-541.
6. Sekretaryova A. N. et al. Total phenol analysis of weakly supported water using a laccase-based microband biosensor // *Analytica chimica acta*. 2016. V. 907. PP. 45-53.

UDC 602.4:628.35:664

DEVELOPMENT OF BOD-BIOSENSOR BASED ON BACTERIA PARACOCCLUS YEEI BKM B-3302

A.Kharkova, S.Alferov, V.Arlyapov

Tula State University, Россия, 300012, Тула, проспект Ленина, 92
e-mail: Anyuta_Zaytseva@mail.ru

The rate constants of the interaction between mediator and bacteria *Paracoccus yeii* and heterogeneous rate constants were obtained to develop biosensor for the rapid BOD₅ determination.

Key words: BOD; biosensor; mediator; bacteria *Paracoccus yeii*

The last decade has been marked by intensive study of analytical capabilities and practical application of biosensor systems [1-3]. Rapid assessment of environmental pollution, in particular, the determination of organic

impurities in surface, groundwater and wastewater, is an important task. The purpose of this work was the use of bacteria *Paracoccus yeei* VKM B-3302, isolated from activated sludge, to create a mediator BOD-biosensor.

The bacteria *P. yeei* were used as microorganisms, since active sludge is an inoculum in the standard analysis method, individual microorganisms isolated from it will ensure the accuracy and correlate with the results of the standard method. Ferrocene and its derivatives, as well as phenazine derivatives (neutral red, thionin, methylene blue) were chosen as mediators. These compounds are widely used as electron mediators from the active center of cell enzymes to the electrode surface.

Cyclic voltammetry was used to investigate the electrochemical properties of the mediators with the analyzer "Ecotest-VA" (LLC Ekoniks-Expert, Russia). As the result the limiting stages were identified, the models of Nicholson [4] and Laviron [5] were used to calculate the heterogeneous electron transfer rate constants. The constants of interaction of mediators with bacteria *P. yeei* were found by cyclic voltammetry using the Nicholson and Schein model [6]. Based on the obtained data, it was established that the most effective mediator for the microorganisms is ferrocene (the interaction constant is $0.013 \pm 0.003 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})$, the heterogeneous electron transfer constant is $0.4 \pm 0.1 \text{ cm}^2/\text{s}$).

A mediator biosensor was formed, based on the "*P. yeei* – ferrocene – carbon-paste electrode" system. It was found that the biosensor allows determine the index of biochemical oxygen demand (BOD₅) in the range of 1.3 - 200 mgO₂/dm³. The duration of a single measurement does not exceed 6 minutes; the receptor system is characterized by long-term operation for 22 days. The sensitivity of the developed biosensor is not inferior to the known analogues.

The analysis of water samples of different origin (swamp, river water) was carried out by standard method and with developed biosensor. Statistical processing of the results showed that the data obtained by both methods differ insignificantly. The developed biosensor can be used as an alternative to standard analysis.

As a result of electrochemical studies of the system "*P. yeei* - mediator - carbon-paste electrode" was identified the most effective mediator - ferrocene (interaction constant - $0.013 \pm 0.003 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})$, heterogeneous electron transfer constant - $0.4 \pm 0.1 \text{ cm}^2/\text{s}$) for the formation of a biosensor. It was established that the sensitivity of the biochemical oxygen consumption developed by the biosensor is not inferior to the known analogues in terms of sensitivity (the lower limit of detectable concentrations 1.3 mgO₂/dm³). Testing the biosensor on ten water samples of different origin showed that the developed biosensor can be used as an alternative to the standard analysis.

The study was carried out by a grant from the Russian Science Foundation (project № 17-74-10078).

References:

1. Hu J., Gao G., Xia S. A Mediated BOD Microsensor Based on Poly (Neutral Red) and Bacteria Modified Interdigitated Ultramicroelectrode Array // *International journal of electrochemical science*. 2016. V. 11. I. 7. P. 6387-6402.
2. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue / Niyomdech S. Limbut W., Numnuam A. et al. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017. V. 241. P. 473-481.
3. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium / G. Gao, J. Qiana, D. Fang et al. // *Analytica chimica acta*. 2016. V. 924. P. 21-28.
4. Ribau I., Fortunato E. A Simple Procedure to Fabricate Paper Biosensor and Its Applicability—NADH/NAD⁺ Redox System // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018. V. 6. PP. 175-187.
5. Bravo I., Revenga-Parraabc M., Weberd K., Popp J., Pariente F., Lorenzo E. One-step reduced/quinone functionalized graphene oxide as reagentless lactate biosensing platform // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018. V. 267. P. 533-541.
6. Sekretaryova A. N. et al. Total phenol analysis of weakly supported water using a laccase-based microband biosensor // *Analytica chimica acta*. 2016. V. 907. PP. 45-53.

УДК 615.466

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ МОДЕЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ

Кувшинова Е.А.¹, Петракова Н.В.², Сергеева Н.С.¹, Тетерина Н.Ю.², Каралкин П.А.¹, Свиридова И.К.¹

¹ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

² ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН
125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д.3
e-mail: prognoz.06@mail.ru

Разработан метод функционализации остеопластических кальцийфосфатных материалов модельными соединениями белковой природы (бычий сывороточный альбумин и факторы роста лизата тромбоцитов). Метод основан на инкорпорации соединений на поверхность материала в процессе биомиметического осаждения фосфатов кальция из концентрированных солевых растворов.

Ключевые слова: функционализация, биомиметическое осаждение, октакальциевый фосфат, факторы роста, лизат тромбоцитов

Одно из приоритетных направлений современного биоматериаловедения – функционализация материалов путем иммобилизации на их поверхность биологически активных соединений и лекарственных препаратов с целью придания им дополнительных терапевтических свойств.

Цель работы – разработка метода функционализации кальцийфосфатных (КФ) материалов модельными белковыми соединениями и исследование динамики их высвобождения.

Материалы и методы. В работе использовали гранулированные КФ материалы: октакальциевый фосфат (ОКФ), β-трикальциевый фосфат, нативный β-ТКФ и минерализованный β-ТКФ (β-ТКФ_{мин.}). Минерализацию поверхности β-ТКФ проводили путем биомиметического осаждения фосфатов кальция из двукратно концентрированного раствора, моделирующего внутреннюю среду организма (2хSBF). Функционализацию модельными соединениями (бычьим сывороточным альбумином (БСА, концентрация 3,0 и 6,0 мг/мл) и факторами роста (ФР) лизата тромбоцитов (ЛТ) человека (концентрация общего белка в ЛТ 5,0 и 10,0 мг/мл)) производили путем выдерживания материала в различных буферных растворах (TRIS, DPBS, SCS и модифицированном SBF (SBF_{мод.})), содержащих инкорпорируемое соединение. Эффективность инкорпорации оценивали путем измерения концентрации инкорпорируемого соединения в растворе до и после инкубации с материалами с использованием BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США) и иммуноферментного анализа ELISA (Ebioscience, США).

Результаты. Установлено, что на поверхность ОКФ (в сравнении с β-ТКФ и β-ТКФ_{мин.}) встраивается достоверно больше БСА. Поэтому далее в качестве модельного материала использовали ОКФ. Инкорпорация БСА на поверхность ОКФ в процессе биомиметического осаждения слоя фосфатов кальция из буферных КФ систем (SCS, SBF_{мод.} и DPBS) оказалась более эффективной, в сравнении с инкорпорацией в органическом TRIS-буфере, не содержащем солей кальция и фосфора. Наиболее эффективной оказалась инкорпорация в растворе SCS.

Показано, что ФР составляют лишь незначительную часть от общего белка ЛТ. Соответственно и количества встроенных в ОКФ ФР составили миллионные доли от общего количества встроенного белка ЛТ. По инкорпорационной способности исследованные ФР образовывали следующую последовательность: PDGF-AA > PDGF-AB > IGF = VEGF > PDGF-BB. Анализ динамики высвобождения БСА, общего белка и отдельных ФР ЛТ из функционализированного ими ОКФ выявил, что БСА высвобождается существенно медленнее (45% за 6 суток), чем общий белок и ФР ЛТ (100% за 3 ч. и 0,5 ч. соответственно).

Заключение. Апробирована методика функционализации поверхности разных керамических материалов белковыми соединениями путем их инкорпорации в процессе биомиметического осаждения в новообразованный кальцийфосфатный слой. Значимые различия в адгезионной способности и в динамике выхода БСА, общего белка и ФР ЛТ свидетельствуют о “неуниверсальности” методологии. То есть потребуются подбор условий для функционализации материала каждым биологически активным соединением или лекарственным препаратом для достижения требуемой динамики высвобождения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-11052

UDC 614.46b

DEVELOPMENT OF THE SURFACE FUNCTIONALIZATION METHOD OSTEOPLASTIC MATERIALS BY MODEL PROTEINS

Kuvshinova E.A.¹, Petrakova N.V.², Sergeeva N.S.¹, Teterina A.Y.², Karalkin P.A.¹, Sviridova I.K.¹

¹ Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,

² A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Material Science RAS

125284, 2-nd Botkin pass, 3, Moscow, Russia

e-mail: prognoz.06@mail.ru

A method for the functionalization of osteoplastic calcium phosphate materials by model protein compounds (bovine serum albumin and platelet lysate growth factors) has been developed. The method is based on the incorporation of compounds on the surface of the material in the process of biomimetic precipitation of calcium phosphates from concentrated salt solutions.

Key words: functionalization, biomimetic coating, octacalcium phosphate (OCP), grow factors (GF), platelet lysate (PL)

The high-priority concept of modern researches is the functionalization of materials by immobilizing bioactive molecules and drugs on their surface in order to give them additional therapeutic properties. The aim of the work is to develop a method for the functionalization of calcium phosphate (CF) materials by model protein compounds and to study the dynamics of their release.

Materials and methods. In this work we used granulated CF materials: OCP, native β -tricalcium phosphate (β -TCP) and mineralized β -TCP (β -TCP_{min}). The β -TCP surface mineralization was performed by biomimetic precipitation of calcium phosphates from a double concentrated simulated body fluid (2xSBF). Functionalization with model compounds (bovine serum albumin (BSA, concentration 3.0 and 6.0 mg / ml) and growth factors of human platelet lysate (total protein concentration in PL 5.0 and 10.0 mg / ml)) produced by soaking the material in various buffer solutions (TRIS, DPBS, SCS and modified SBF (SBF_{mod})) containing the incorporated compound. The efficiency of incorporation was evaluated by measuring the concentration of the incorporated compound in the solution before and after incubation with materials using the BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA) and ELISA (Ebioscience, USA).

Results. It was established that significantly more BSA is embedded on the surface of the OCP (in comparison with β -TCP and β -TCP_{min}). Therefore, further, OCP was used as a model material. The co-precipitation of BSA on the OCP surface in the process of biomimetic deposition of a layer of calcium phosphate from CF buffer (SCS, SBF_{mod} and DPBS) proved to be more effective compared to incorporation in an organic calcium-phosphor-free TRIS buffer. Incorporation in a SCS solution was the most effective.

We determinate, that amount of loading proteins on the OCP surface was significantly more then on the β -TCP surface or β -TCP_{min} surface. So, hereafter we use only OCP in our study. The BSA biomimetic co-precipitation from calcium phosphate buffers (SCS, SBF_{mod} and DPBS) was more efficient then loading from TRIS-buffer. And the usage of SCS buffer was the most effective.

It has been shown that total GFs amount only an insignificant part of the total PL protein. Respectively, the number of incorporated into the OCP GF made millionths of the total amount of the inserted PL proteins. In terms of their incorporation capacity, the studied GFs formed the following sequence: PDGF-AA > PDGF-AB > IGF = VEGF > PDGF-BB. Analysis of the dynamics of BSA release, PL total protein and individual GFs of PL from functionalized OCP revealed that BSA is released much slower (45% in 6 days) than total protein and GF of PL (full release occurs in 3 hours and 0.5 hours respectively).

Conclusion. The technic of functionalization of the surface of different CF materials with protein compounds founded on biomimetic approach has been proposed. Significant differences in incorporation capacities and in the dynamics of the release of BSA, PL total protein and PL GFs testify to the "non-universality" of the method. That is, it will be necessary to select the conditions for the functionalization of the material with each biologically active compound or drug to achieve the desired release dynamics.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-29-11052.

УДК 579.63

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Кузнецова М.С., Буторова И.А., Сардушкин М.В.

Кафедра технологии химико-фармацевтических и косметических средств, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125047 г. Москва, Миусская пл. д.9
e-mail: pochta@muctr.ru; marieserge1010@gmail.com

Выполнены основные этапы разработки методики антимикробной активности косметической продукции.

Ключевые слова: антимикробная активность; масло чайного дерева; триклозан; жидкое мыло.

Целью исследований являлись разработка методики и выбор критериев оценки антимикробной активности отдельных видов косметической продукции. Работа проводится по инициативе ФБУ «Ростест-Москва» для последующей валидации и гостирования разработанной методики. Исследована антимикробная активность образцов жидкого мыла с добавками: триклозаном (как наиболее распространенного антимикробного компонента) и эфирным маслом чайного дерева (антисептический компонент растительного происхождения).

Оценку антимикробной активности приготовленных образцов жидкого мыла проводили в отношении естественной микрофлоры рук методом смывов и в отношении санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ) диско-диффузионным методом по величине зоны отсутствия роста на агаризованной среде тест-организмов (*Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Bacillus subtilis* ВКПМ – В-13183, *Pseudomonas aeruginosa* ВКПМ – В-8243).

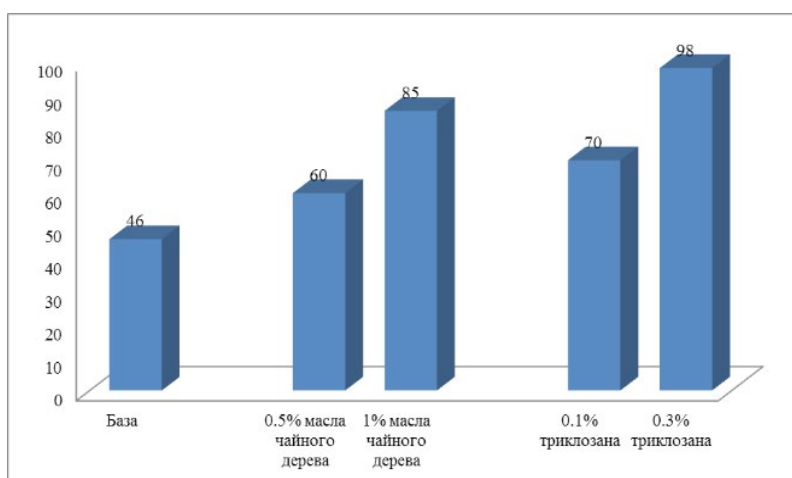


Рис. 1. Оценка антимикробного действия жидкого мыла в отношении естественной микрофлоры рук.

Как показали исследования, образцы жидкого мыла с добавками масла чайного дерева и триклозана проявляли антимикробную активность в отношении естественной микрофлоры рук (рис. 1) [1, 2]. При этом в отношении СПМ для мыла с маслом чайного дерева антимикробная активность выявлена только в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli* (рис. 2) [3]. В отношении грамположительных бактерий *S. aureus* и *B. subtilis* отмечалось незначительное повышение антимикробной активности (на 17 и 10 % соответственно) только при максимально разрешенной концентрации компонента в 1%. Для мыла с триклозаном обнаружена антимикробная активность в отношении *S. aureus*, *E. coli* и *B. subtilis* (рис. 3). В отношении бактерий *P. aeruginosa* и дрожжей *C. albicans* антимикробное действие исследованных образцов мыла как с маслом чайного дерева, так и триклозаном не обнаружено. В настоящее время исследования продолжаются.

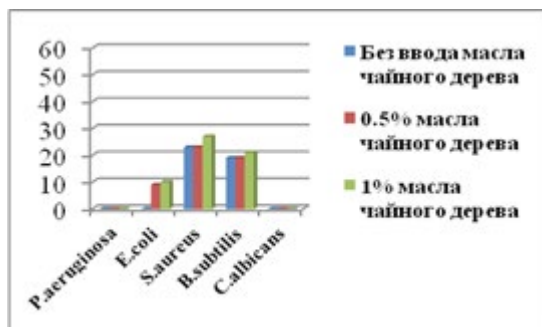


Рис. 2. Величина зоны ингибирования мыла с маслом чайного дерева в отношении СПМ

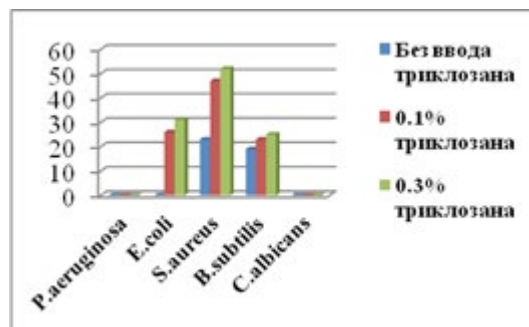


Рис. 3. Величина зоны ингибирования мыла с триклозаном в отношении СПМ

Литература:

1. МУК 4.2.734-99 Микробиологический мониторинг производственной среды.
2. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1. / кол. авторов // под ред. Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – М.: Бином, 2008. 1080 с.
3. ГФ XIII ОФС 1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.

UDK 579.63

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR ANTIMICROBIAL ACTION ANALYSIS OF COSMETIC PRODUCTS

Kuznetsova M.S., Butorova I.A., M.V. Sardushkin

Department of Technology of Chemical Pharmaceutical and Cosmetic Products, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation
125047 Moscow, Miusskaya sq., 9
e-mail: pochta@muctr.ru; marieserge1010@gmail.com

The main stages of the development of the antimicrobial activity method for cosmetic products have been completed.

Key words: antimicrobial activity; tea tree oil; triclosan; liquid soap.

The study aims the development of methods and the selection of criteria for evaluating the antimicrobial activity of certain types of cosmetic products. The work is carried out on the initiative "Rostest-Moscow" for the subsequent validation and accommodation of the developed methodology. The antimicrobial activity of samples of liquid soap with antimicrobial additives (triclosan as the most common antimicrobial component and the essential oil of tea tree from the list of natural components) was investigated.

Evaluation of the antimicrobial activity of the prepared samples of liquid soap was carried out in relation to natural microflora of hands using the wash method and in relation to sanitary-indicative microorganisms by the disk-diffusion method according to the size of the lack of growth zone on agar medium of test-organisms (*Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Bacillus subtilis* VKPM – B-13183, *Pseudomonas aeruginosa* VKPM – B-8243).

Studies have provided evidence that samples of liquid soap with antimicrobial additives (tea tree oil and triclosan) showed antimicrobial activity against the natural microflora of the hands (Fig. 1) [1, 2]. At the same time, in relation to sanitary-indicative microorganisms of soap with tea tree oil, antimicrobial activity was detected only with respect to gram-negative bacteria *E. coli* (Fig. 2) [3]. Antimicrobial activity against *St. aureus*, *E. coli* and *B. subtilis* was detected in relation to the soap with triclosan (Fig. 3). With respect to the bacteria *P. aeruginosa* and the yeast *C. albicans*, the antimicrobial action of the investigated soap samples with either tea tree oil and triclosan was not detected. Further research is being conducted.

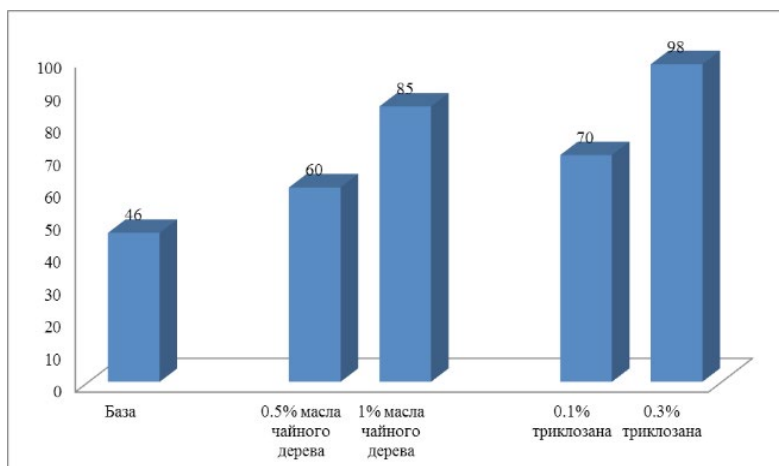


Fig. 1. Evaluation of the antimicrobial action of liquid soap in relation to the natural microflora of the hands.

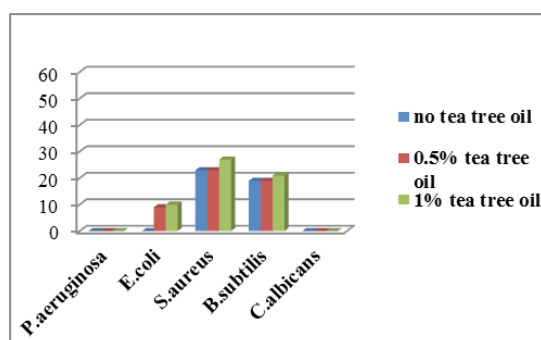


Fig. 2. The size of the zone of inhibition of soap with tea tree oil in relation to sanitary-indicative microorganisms

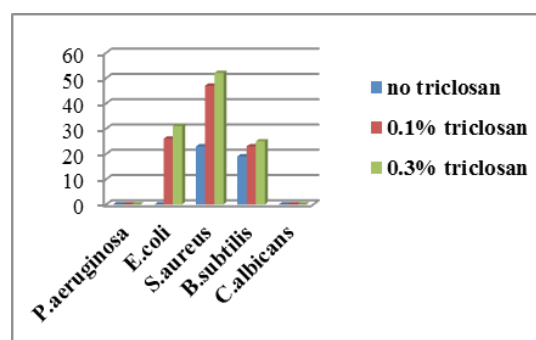


Fig. 3. The size of the zone of inhibition of soap with triclosan in relation to sanitary-indicative microorganisms

References:

1. MUK 4.2.734-99 Mikrobiologicheskiy monitoring proizvodstvennoy sredy.
2. *Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya. Kniga 1. / Sbornik avtorov // Pod red. Labinskaya A.S., Volina Ye.G. - M.: Binom, 2008. 1080 s.*
3. GF XIII OFS 1.2.4.0010.15 Opredeleniye antimikrobnoy aktivnosti antibiotikov metodom diffuzii v agar.

УДК: 577.1 51, 577.181.4

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ТЕТРАЦИКЛИНА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАН-АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ

Приходько Д.В., 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 концентрация оптимального включения антибиотика, определена ёмкость наночастиц по тетрациклину, получены параллельный и последовательный профили высвобождения препарата при значениях pH различных отделов желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: хитозан-альгинатные микрочастицы, адресная доставка лекарств, тетрациклина гидрохлорид, желудочно-кишечный тракт

В настоящее время разработка систем адресной доставки лекарственных препаратов представляет значительный научный и практический интерес, так как позволяет существенно снизить вероятность побочных эффектов от препаратов, ослабить их или же в принципе устранить. В то же время эффективность лекарства увеличивается за счёт увеличения локальной концентрации в целевых клетках, что позволит уменьшить его количество за курс приёма.

Тетрациклины – группа поликетидных антибиотиков широкого спектра действия. Их механизм действия на клетку состоит в ингибировании связывания аминоацил-т-РНК с соответствующим участком на 30S-субъединицы бактериальной рибосомы [1]. Тетрациклиновые антибиотики обладают значительным количеством побочных эффектов, обусловленных невозможностью создания равномерной терапевтической концентрации действующего вещества в крови и тканях, а также отличается невысокой биодоступностью и высокой степенью выведения из организма до начала лечебного действия [2]. При поступлении в организм тетрациклин может оказывать негативное воздействие на микрофлору кишечника, нарушая ее баланс за счет подавления роста чувствительных бактерий и роста резистентной флоры на фоне охраняющейся бактерицидной активности по отношению к облигатной анаэробной флоре ([1]. В работе [3] показана эффективность включения тетрациклинов в микрокапсулы двойные оболочки, состоящие из водонерастворимого полимера ацетилцеллюлозы и водорастворимого полимера (альгинат натрия, поливинилпирролидон).

Поэтому целью данной работы является разработка систем адресной доставки окситетрациклина на основе хитозан-альгинатных микрокапсул. И хитозан, и альгинат натрия биосовместимы с тканями организма человека, не вызывают аллергических реакций и отторжения. Проведены исследования по разработке носителя в форме микрокапсул на основе хитозана и альгината натрия, для антибиотика тетрациклина, включённого ВОЗ в список важнейших лекарственных средств. Определена емкость хитозан-альгинатных микрокапсул по антибиотику, а также изучен последовательный и параллельный режим его высвобождения при различных значениях pH среды, моделирующих разделы ЖКТ. Установлено, что максимальное высвобождение окситетрациклина наблюдается при pH 6,0-7,0, что соответствует кислотности тонкого отдела кишечника. Также благодаря включению антибиотика в микрокапсулы обеспечивается пролонгированность его действия.

Литература:

1. Зайцева Н.В., Шур П.З., Аминова А.И., Кирьянов Д.А., Камалтдинов Марат Решидович К оценке дополнительного риска заболеваний желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с дисбиозом кишечной микрофлоры вследствие воздействия остаточных концентраций тетрациклина в пищевых продуктах // Здоровье населения и среда обитания. 2012. №7. С.46-48
2. Грехнёва Е. В., Власова В. В. Особенности микрокапсулирования окситетрациклина и цефтриаксона в двойные оболочки // Auditorium. – 2017. – №. 2 (14). – С. 19-23.
3. Грехнёва Е.В., Мезенцева И.В. Использование сополимеров метилметакрилата и метакриловой кислоты совместно с водорастворимыми полимерами для микрокапсулирования БАВ // Актуальные проблемы химии, химической технологии и химического образования: материалы Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. Курск, 2015. С. 42–46.

UDC: 577.1 51, 577.181.4

DEVELOPMENT OF THE DRUG DELIVERY SYSTEM OF TETRACYCLINE ON THE BASIS OF CHITOSAN-ALGINATE MICROPARTICLES

Prikhodko D.V., Krasnoshtanova A.A.

Russian Chemical-Technological University. DI. Mendeleev, Moscow, Russia 125047, Moscow, Miusskaya sq., 9.
e-mail: aak28@yandex.ru

The concentration of the optimal inclusion of the antibiotic was determined, the capacity of nanoparticles by tetracycline was determined, parallel and sequential release profiles of the drug were obtained at pH values of different sections of the gastrointestinal tract.

Key words: chitosan-alginate microparticles, drug delivery, tetracycline hydrochloride, gastrointestinal tract

Currently, the development of systems for targeted drug delivery is of considerable scientific and practical

interest, since it can significantly reduce the likelihood of side effects from drugs, weaken or completely eliminate them. At the same time, the effectiveness of the drug increases due to an increase of the local concentration in the target cells, which will reduce its quantity during the course of administration.

Tetracyclines are a group of broad-spectrum polyketide antibiotics. Their mechanism of action on the cell consists in inhibiting the binding of the aminoacyl-tRNA to the corresponding region on the 30S-subunit of the bacterial ribosome [1]. Tetracycline antibiotics have a significant amount of side effects due to the impossibility creating a uniform therapeutic concentration of the active substance in the blood and tissues, and also has a low bioavailability and a high degree of excretion from the body before the onset of therapeutic action [2]. When tetracycline is introduced into the body, it can have a negative effect on the intestinal microflora, disrupting its balance by suppressing the growth of sensitive bacteria and the growth of resistant flora against the background of protected bactericidal activity with respect to obligate anaerobic flora [1]. In the work [3], the efficiency of the inclusion of tetracyclines in double-shell microcapsules consisting of a water-insoluble cellulose acetate polymer and a water-soluble polymer (sodium alginate, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone) was shown.

Therefore, the aim of this work is to develop systems for targeted delivery of oxytetracycline based on chitosan-alginate microparticles. Both chitosan and sodium alginate are biocompatible with the tissues of the human body, don't cause allergic reactions and rejection. Conducted research on the development of media in the form of microparticles based on chitosan and sodium alginate, for the antibiotic tetracycline, which is included by WHO in the list of essential drugs. The capacity of chitosan-alginate microparticles was determined by antibiotic, and the sequential and parallel mode of its release was studied at various pH values of the medium simulating sections of the gastrointestinal tract. It was established that the maximum release of oxytetracycline is observed at pH 6.0-7.0, which corresponds to the acidity of the small intestine. Also, due to the inclusion of the antibiotic in the microparticles, the prolongation of its action is ensured.

References:

1. Zaitseva NV, Shur PZ, Aminova AI, Kiryanov DA, Kamaltdinov Marat Reshidovich. Assessing the additional risk of gastrointestinal diseases associated with intestinal microflora dysbiosis due to exposure to residual concentrations of tetracycline in food products // *Public health and environment*. 2012. №7. p.46-48.
2. Grekhneva YV, Vlasova VV Features of microencapsulation of oxytetracycline and ceftriaxone in double shells // *Auditorium*. - 2017. - №. 2 (14). - p. 19-23.
3. Grekhneva EV, Mezentsева IV The use of copolymers of methyl methacrylate and methacrylic acid in conjunction with water-soluble polymers for the micro-encapsulation of biologically active substances // *Actual problems of chemistry, chemical technology and chemical education: materials All-Russian scientific practical conference with International participation. Kursk, 2015*. p. 42-46

УДК 579.61/ 54.057

СОЗДАНИЕ УСТОЙЧИВОГО БИОЦИДНОГО СЛОЯ НА СТЕКЛЯННОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Беловежец Л.А., Мареев А.В.

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1
e-mail: lyu-sya@yandex.ru

Исследована биоцидная активность синтезированного полимера на основе четвертичного аммониевого центра с липофильным заместителем длиной C₁₆ против микроорганизмов различных таксономических групп.

Ключевые слова: биоцидная активность, четвертичная аммониевая соль

Целью настоящего исследования являлась химическая модификация стекла и придание его поверхности биоцидной активности. В качестве якорной группировки была выбрана триэтоксисилильная функция. Биологическая активность обуславливалась четвертичным аммониевым центром с липофильным заместителем длиной C₁₆. N,N-диметилгексадецил(3-триэтоксисилилпропил)аммоний хлорид был получен нами по реакции Меншуткина из диметилциклогексиламина и (3-хлорпропил) триэтоксисилана в среде ацетонитрила при нагревании в ампуле при 120°C в течение 2 ч и далее при 130°C в течение 3.5 ч. В этом случае достигалась 100% конверсия исходного амина по данным ЯМР ¹³C. Полученная таким образом

четвертичная аммониевая соль (ЧАС) представляет собой вязкое масло оранжево-красного цвета, ограниченно растворимое в метаноле, этаноле, ацетонитриле и неограниченно – в хлороформе. В воде и ацетоне полученная ЧАС не растворяется, образуя эмульсию. Стеклянные пластинки площадью ~2 см², предварительно выдержанные в концентрированном щелочном растворе, отмытые водой, изо-пропанолом и высушенные на воздухе при комнатной температуре обрабатывали раствором ЧАС в хлороформе (75 мкл). Пластинки выдерживали на воздухе до испарения хлороформа (10-15 мин), а затем в течение 1 ч в сушильном шкафу при температуре 140°C. При этом на поверхности стекла формировалась полимерная пленка. На пленки исследуемого вещества наносилась взвесь бактерий (*Enterococcus durans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) в концентрации 10⁹ КОЕ/мл, высушивалась в условиях микробиологического бокса до полного высыхания, затем смывалась стерильной дистиллированной водой. Посев 50 мкл смывных вод производился на соответствующие твердые питательные среды. Инкубация проводилась при 37°C в течение 5 суток с ежедневной оценкой роста микроорганизма. Положительным результатом считалось полное отсутствие роста микроорганизма к концу эксперимента. Первоначально была определена концентрационная зависимость антибактериальной активности полученных пленок. Рост *Bacillus subtilis* не подавляется даже при использовании 50% раствора ЧАС. Минимальная действующая концентрация против *Escherichia coli* составила 8%, что соответствует 4.5 мг ЧАС на 1 см² поверхности и 2.5% против *Enterococcus durans*, что соответствует 1.4 мг ЧАС на 1 см² поверхности. Оптимизацию условий нанесения пленки на стеклянную подложку осуществляли по температуре и времени высушивания. Пластинки с нанесенным 8% р-ром ЧАС в хлороформе высушивали в течение 1 ч при температурах 110-130°C с шагом в 10°C. Результаты испытаний на антибактериальную активность показали отсутствие подавления роста *Escherichia coli* при температурах высушивания ниже 140°C. При этом по отношению к энтерококкам активность пленок, высушенных при 130°C, сохранялась. Исследования показали, что наиболее важным параметром является температура, а не время высушивания. Так, снижение времени высушивания пленки при 140°C с 1 часа до 20 мин не сказывается на ее антибактериальной активности, а существенное увеличение времени высушивания при более низких температурах не приводит к ее усилению. Образцы стекол с нанесенной пленкой (8% р-р ЧАС, 140°C, 20 мин) были испытаны на длительность антибактериального действия в циклических экспериментах, в которых на пленку наносилась взвесь микроорганизма, производился посев, затем пленка отмывалась дистиллированной водой, высушивалась и снова обрабатывалась взвесью микроорганизма. Антибактериальная активность по отношению к обоим тестовым культурам (*Enterococcus durans*, *Escherichia coli*) сохранялась в течение 9 циклов. Мягкие моющие средства (жидкое мыло) не позволяют удалить пленку со стекла, и после обработки антибактериальная активность сохраняется, в то время как средства с абразивным компонентом («Пемолюкс», «Пемоксоль») удаляют пленку так же, как хлороформ. Поверхность стеклянной подложки при этом остается гидрофобной, но антибактериальная активность теряется.

Таким образом, нами было показано, что исследованное вещество проявляет активность по отношению к *Enterococcus durans* и *Escherichia coli*, тогда как рост *Bacillus subtilis* не подавляется. Подобрана оптимальная концентрация действующего вещества для каждого микроорганизма. Для *Enterococcus durans* – это 1.4 мг/см² для *Escherichia coli* – 4.5 мг/см². Подобраны оптимальные условия нанесения пленок – 140 °C, 20 мин. Показано, что мягкая обработка ПАВ не снижает активность пленок. Нанесенная в оптимальных условиях пленка (8% р-р) не теряет своей активности в течение 9 последовательных опытов.

UDK 579.61/ 54.057

THE FORMATION OF A RESISTANT BIOCIDAL FILM ON THE GLASS SURFACE

Belovezhets L.A., Mareev A.V.

A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russia
664033, Irkutsk, Favorskogo st., 1
e-mail: lyu-sya@yandex.ru

Organosilicon polymer bearing a quaternary ammonium center and linear lipophilic C₁₆ carbon chain was synthesized and studied for biocide activity against microorganisms of different

Key words: biocidal activity, Quaternary ammonium salt

The purpose of current study is a chemical modification of the glass surface and imparting biocide activity to its exteriority. Triethoxysilyl function was chosen as an anchor group. Biological activity was due to the quaternary

ammonium center with the lipophilic substituent as a linear C₁₆ chain. N,N-dimethylhexadecyl (3-triethoxysilylpropyl) ammonium chloride was prepared in Menshutkin reaction from dimethylhexadecyl amine and (3-chloropropyl) triethoxy silane in acetonitrile media under the heating in a sealed ampoule at 120°C for 2 h and then at 130°C for 3.5h. In that case 100% conversion of initial amine was achieved based on ¹³C NMR analysis. The quaternary ammonium salt (QAS) obtained in such a way was viscous orange to red oil that is slightly soluble in methanol, ethanol, acetonitrile and very soluble in chlorophorm. Our QAS shows no solubility in water and acetone but gives emulsion. Glass plates with ~2 cm² area was initially stayed in concentrated alkali solution then washed with water, iso-propyl alcohol and dried on air at room temperature and finally treated with the QAS solution in chlorophorm (75 µl). Plates were exposed on air up to evaporation of chlorophorm (10-15 min) and then placed into the drying oven at the 140°C for 1 h. Polymeric film has been forming on the plate's surface. The bacterial suspension of 10⁹ CFU/ml (*Enterococcus durans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) was placed onto the film and dried under aseptic conditions up to total drying and then was washed out by sterile distilled water. 50 µl flush water inflict on solid culture media. Incubation was carried out at 37°C for 5 days with a daily assessment of the growth of the microorganism. The positive result was the total absence of the growth of the microorganism by the end of the experiment. Initially, the concentration dependence of the antibacterial activity of the obtained films was determined. Growth of *Bacillus subtilis* is not suppressed even when using 50% solution per QAS.

Minimal bactericidal concentration against *Escherichia coli* was 8% that is equivalent to 4.5 mg of QAS per 1 cm² of the surface area and 2.5% against *Enterococcus durans* that is identical to 1.4 mg of QAS per 1 cm² of the surface area. To find the best conditions of film forming process on the glass support temperature optimization and drying time optimization were performed. Plates treated with 8% chlorophorm solution of QAS were drying for 1 h at temperatures 110-130°C with 10°C step. Biocide activity test showed absence of the growth inhibition of *Escherichia coli* for the films prepared at the temperature lower than 140°C. However biocide activity against *Enterococcus durans* for the films dried at 130°C was remained. Investigations revealed that the temperature is more critical parameter then the duration of drying. So, when the drying time for the film was decreased from 1h to 20 min it wasn't affected on the antibacterial activity but considerable time expansion at the lower temperatures didn't turned to the activity enhancement. Samples of glass plates with the formed films (8% solution of QAS, 140°C, 20 min exposure) were tested on the duration of the antibacterial action in cyclic experiments where the bacterial suspension was placed onto the film, then microorganisms was inflicted on solid culture media. Film was cleaned, dried and the experiment was repeated. Antibacterial activity against both test cultures (*Enterococcus durans*, *Escherichia coli*) was persisted for 9 cycles.

Soft detergent (liquid soap) don't remove the film from the glass, and after processing the antibacterial activity is stayed, while detergent with the abrasive component ("Pemoluks", "Pemoxol") delete the film as well as chloroform. The surface of the glass substrate remains hydrophobic, but the antibacterial activity is lost.

Thus, we have shown that the studied substance is active against *Enterococcus durans* and *Escherichia coli*, while the growth of *Bacillus subtilis* is not suppressed. The optimal concentration of the active substance for each microorganism is selected. For *Enterococcus durans* it is 1.4 mg/cm² for *Escherichia coli* - 4.5 mg/cm². The optimal conditions for film application - 140 °C, 20 min. It is shown, soft detergent does not reduce the activity of the films. The film applied under optimal conditions (8% sol.) does not lose its activity during 9 cyclic experiments.

УДК: 669.295, ББК: 34.23

СПЛОШНЫЕ И ПОРИСТЫЕ БИОМАТЕРИАЛЫ ИЗ СВЕРХУПРУГИХ СПЛАВОВ НА ОСНОВЕ TI-ZR-NB ДЛЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ

В.А.Шереметьев¹, С.А.Дубинский¹, Ю.С.Жукова¹, А.А.Коробкова¹, А.С.Кудряшова¹, М.Р.Филонов¹, С.Д.Прокошкин¹, В.Браиловский²

¹НИТУ «МИСиС», Россия, 115419, Москва, 2-й Донской проезд, 9,
e-mail: vadim.sheremetev@gmail.com

²Высшая технологическая школа, Монреаль, Канада

Разработаны технологические основы создания сплошных и пористых материалов из сверхупругих сплавов системы Ti-Zr-Nb методами термомеханической обработки и порошковой металлургии. Новые материалы будут использованы для производства костных имплантатов с уникальным сочетанием биомеханической и биохимической совместимости с костной тканью

Ключевые слова: биоматериалы, титановые сплавы с памятью формы, пористые материалы, термомеханическая обработка, порошковая металлургия, сверхупругость

Потребность в металлическом материале для медицинских имплантатов, сочетающем высокую биомеханическую и биохимическую совместимость с жидкостями и тканями человеческого тела, представляет собой основную мотивацию настоящей работы. Металлические материалы для современных имплантов имеют гораздо более высокий модуль Юнга (более 100 ГПа) по сравнению с костной тканью (1 – 27 ГПа). Различие в упругих модулях приводит к нарушению механико-биологического равновесия в организме человека и, как следствие, к разрушению механического соединения в зоне контакта имплантата и кости во время циклических нагрузок. Низкие значения модуля Юнга (40 – 80 ГПа) и сверхупругое поведение, близкое к поведению костной ткани, демонстрируют сплавы с памятью формы (СПФ). Традиционный СПФ никелид титана (Ti-Ni) содержит токсичный никель, что ограничивает его медицинское применение. В последние десятилетия все больший интерес ученых привлекают безникелевые СПФ на основе системы Ti-Zr-Nb, в состав которой входят только биосовместимые компоненты.

В ходе работы выбран и экспериментально обоснован состав сплава Ti-Zr-Nb: 18% циркония и 14...15% ниобия (в ат.%). Данный состав проявляет наилучший комплекс функциональных свойств: высокий кристаллографический ресурс обратимой деформации (6 %), сверхупругое поведение при температуре человеческого тела и высокую коррозионную стойкость.

Разработаны технологические основы и определены режимы комбинированной термомеханической обработки слитков сплавов на основе системы Ti-Zr-Nb большого развеса для получения полупродуктов в виде прутковых заготовок с наилучшим комплексом свойств определяющим высокую биосовместимость. Термомеханическая обработка включает в себя комбинацию прогрессивных методов обработки металлов давлением (радиально-сдвиговая прокатка, ротационная ковка) как инструментов пластической деформации сплошного материала в сочетании с термическим воздействием.

Разработаны технологические основы получения проницаемых пористых материалов из сплавов на основе системы Ti-Zr-Nb методами классической порошковой металлургии (метод удаляемого порообразователя). Получаемые материалы с открытой пористостью 50-70 % и очень низким модулем упругости 3-15 ГПа, таким же как у костной ткани, способствуют прорастанию костной ткани в месте контакта «имплантат-кость», тем самым обеспечивая надежную механическую связь имплантата и костной ткани.

Разработка основ для технологий выплавки, термомеханической обработки и порошковой металлургии сплавов Ti-Zr-Nb включала в себя комплексные исследования структурно-фазового состояния материала, его механических, функциональных свойств и коррозионно-электрохимического поведения с применением современных методик исследований и испытаний металлических биоматериалов. На основании всестороннего исследования структуры и свойств были определены оптимальные обработки материала.

На основании полученных результатов, и при поддержке индустриального партнера, производителя титановых имплантатов – ООО «КОНМЕТ» (г. Москва) – будут созданы прототипы изделий для ортопедии и спинальной хирургии из сплавов Ti-Zr-Nb в сплошном и пористом состояниях.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект RFMEFI57517X0158).

UDC: 669.295/

BULK AND POROUS BIOMATERIALS BASED ON SUPERELASTIC TI-ZR-NB ALLOYS FOR BONE IMPLANTS

V.Sheremetyev¹, S.Dubinskiy¹, Y.Zhukova¹, A.Korobkova¹, A.Kudryashova¹, M.Filonov¹, S.Prokoshkin¹, V.Brailovski²

¹NUST "MISIS", Russia, 115419, Москва, 2-nd Donskoy proezd, 9, 9
 e-mail: vadim.sheremetyev@gmail.com

²Ecole de technologie superieure, Montreal (Quebec), Canada

Technological principles for creating bulk and porous materials based on superelastic Ti-Zr-Nb alloys using the methods of thermomechanical treatment and powder metallurgy have been developed. New materials will be used for the manufacturing of bone implants having a unique combination of biomechanical and biochemical compatibility with bone tissue.

Key words: biomaterials, titanium shape memory alloys, porous materials, thermomechanical treatment, powder metallurgy, superelasticity

The requirement for a metallic material for medical implants comprising high biomechanical and biochemical compatibility with liquids and tissues of a human body implies the motivation for the present work. Metallic materials of contemporary implants exhibit much higher Young's modulus (more than 100 GPa) compared with that of bone tissue (1-27 GPa). The difference between the elastic moduli leads to the disturbance of mechanical-biological balance in a human body and, consequently, to the failure of mechanical bond in the implant-bone area during cyclic loading. Shape memory alloys (SMA) exhibit favorable low Young's modulus values (40-80 GPa) and superelastic behavior similar to that of bone tissue. Conventional SMA - titanium nickelide (Ti-Ni) - contains toxic nickel which inhibits its medical application. During past decades R&D area shows growing interest in nickel-free SMA based on Ti-Zr-Nb system which includes only biocompatible elements.

In the present work, the chemical composition of Ti-Zr-Nb alloy is developed and experimentally validated: 18% Zr and 14...15% Nb (at.%). This composition provides the best combination of functional properties: the large crystallographic resource of recoverable strain (6%), superelastic behavior at human body temperature and high corrosion resistance.

The obtained results include the technological basis and the regimes of combinational thermomechanical treatment of large Ti-Zr-Nb ingots to fabricate bars semi-products with the best combination of properties ensuring high biocompatibility. Thermomechanical treatment comprises the combination of advanced metal forming techniques (radial shear rolling, rotary forging) as the methods of bulk material deformation combined with heat treatment.

Technological principles of permeable porous Ti-Zr-Nb based materials production using conventional powder metallurgy techniques (space holder method) have been developed. The developed materials featuring 50-70% porosity and very low Young's modulus of 3-15 GPa matching that of bone promote bone tissue ingrowth in implant-bone interface thus providing reliable mechanical bonding of the device with host tissues.

The development of technological basis of Ti-Zr-Nb alloys' melting, thermomechanical treatment, and powder metallurgy included complex investigations of the materials' structural and phase state, their mechanical, functional properties alongside the corrosion and electrochemical behavior involving modern research and testing methods for metallic biomaterials. Taking into account the results of the multi-level structure and properties studies the optimal treatment regimes have been elaborated.

Based on the obtained results and the support from the industrial partner - CONMET Ltd. (Moscow) producing titanium implants - the prototypes of orthopedic and spinal surgery devices made of bulk and porous Ti-Zr-Nb material will be developed.

The present work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project ID RFMEFI57517X0158)

УДК 543

СРАВНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ ДЕКСТРАНСУЛЬФАТА НАТРИЯ И ТАНИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Митрофанова А.Н.¹, Вострикова А.М.¹, Шпунтова Д.В.¹, Бакал А.А.¹, Сухоруков Г.Б.^{1,2}, Горячева И.Ю.¹

¹Саратовский государственный университет, Саратов, Россия

²Queen Mary University of London, London, United Kingdom

Саратовский Государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт Химии, 410012, Саратов, Астраханская, 83

e-mail: stasia.nik19961@yandex.ru

Был проведен гидротермальный синтез углеродных наночастиц на основе декстрана сульфата натрия и таниновой кислоты. Полученные частицы сравнивали на основе спектроскопических методов.

Ключевые слова: углеродные наночастицы, таниновая кислота, декстрансульфат натрия, гидротермальный синтез

Использование углерода в качестве материала для получения наночастиц привело к получению большого количества разнообразных люминесцентных меток. Это открывает новые возможности для использования таких наночастиц в области биомедицины, фармакологии, контроле качества продуктов питания и объектов окружающей среды. От большинства других классов углеродные наночастицы

(УНЧ)отличаются хорошей биосовместимостью, низкой токсичностью, простыми и дешевыми методами синтеза. Оптические свойства УНЧ не уступают полупроводниковым квантовым точкам.

В нашей работе синтезировали УНЧ из декстрансульфата натрия и таниновой кислоты гидротермальным методом. Проводили сравнение свойств полученных УНЧ с помощью спектроскопических методов. Для увеличения интенсивности испускания варьировали pH с помощью добавления кислот и щелочей. Полоса эмиссии полученных наночастиц лежит в области 350-400 нм (сине-зеленые УНЧ). Изменение pH не влияет на положение спектров испускания, но значительно изменяет интенсивность фотолюминесценции. В течении 30 дней полученные УНЧ стабильны.

Работа выполнена при поддержке МОН (проект 4.1063.2017/4.6).

UDC 543

COMPARISON OF OPTICAL CHARACTERISTICS OF CARBON NANOPARTICLES OBTAINED ON THE BASIS OF DEXTRAN SULFATE SODIUM SALT AND TANNIC ACID

Mitrofanova A.N.¹, Vostrikova A.M.¹, Shpuntova D.V.¹, Bakal A.A.¹, Sukhorukov G.B.², Goryacheva I.Yu.¹

¹Saratov State University, Saratov, Russia

²Queen Mary University of London, London, United Kingdom

Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, Institute of Chemistry, 410012, Saratov, Astrakhanskaya, 83
e-mail: daria.shpuntova@gmail.com

A hydrothermal synthesis of carbon nanoparticles based on folic acid was carried out. The particles obtained were characterized by optical, IR-spectroscopy and Raman scattering.

Key words: carbon nanoparticles, dextran sulfate sodium salt, tannic acid, hydrothermal synthesis

The use of carbon as a source for the production of nanoparticles has resulted in a large number of various luminescent labels. This opens up new opportunities for the application of such nanoparticles in the fields of biomedicine, pharmacology, food and environmental control. Carbon nanoparticles (CNPs) are distinguished from most other classes by good biocompatibility, low toxicity, simple and cheap synthesis. The optical properties of CNPs are not inferior to semiconductor quantum dots.

In our work, CNPs was synthesized from sodium dextran sulfate and tannic acid by the hydrothermal method. The properties of the obtained CNPs were compared using spectroscopic methods. To increase the intensity of the emission, the pH was varied by adding acids and alkalis. The emission band of the obtained nanoparticles lies in the region of 350–400 nm (blue-green CNPs). The change of pH does not affect the position of the emission spectra, but significantly changes the intensity of the photoluminescence. Within 30 days it was noted that the CNPs remain stable.

The work was supported by Russian Ministry of Science and Education, project 4.1063.2017/4.6

УДК 57.084.1, ББК: 34.25

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ТИТАНА И ТИТАНОВЫХ СПЛАВОВ С ЭФФЕКТОМ ПАМЯТИ ФОРМЫ IN VITRO

Сергиенко К.В., Конушкин С.В., Беспмятнова А.

ИМЕТ РАН, РФ, 119334, Москва, Ленинский пр-т, 49,

e-mail: shulf@yandex.ru

На сегодняшний день известно множество биосовместимых металлических, керамических и композиционных материалов, однако поиск более функциональных и безопасных материалов продолжается, что постепенно открывает новые возможности лечения и следственно улучшения качества жизни пациентов. Современной группой материалов для сосудистых имплантатов является сплавы с ЭПФ и сверхэластичности. Основным её представителем можно назвать никелид титана. Однако данный сплав имеет явный недостаток в виде высокого содержания потенциально токсичного и аллергенного металла – никеля. В качестве

альтернативного материала, создан безникелевый титановый сплав. Несмотря на достойные механические свойства, биосовместимость данного сплава с клетками и тканями человека не изучалась. Целью работы является исследование биосовместимости сплава Ti20Nb10Ta5Zr с помощью клеточных культур.

Ключевые слова: биосовместимость, титан, титановые сплавы

Титан и его сплавы так же широко применяются в медицинской практике. В работе приведена сравнительная оценка биосовместимости *in vitro* Ti, NiTi, TiNbTaZr.

Введение. На сегодняшний день известно множество биосовместимых металлических, керамических и композиционных материалов, однако поиск более функциональных и безопасных материалов продолжается, что постепенно открывает новые возможности лечения и следственно улучшения качества жизни пациентов. Современной группой материалов для сосудистых имплантатов является сплавы с ЭПФ и сверхэластичности. Основным её представителем можно назвать никелид титана. Однако данный сплав имеет явный недостаток в виде высокого содержания потенциально токсичного и аллергенного металла – никеля. В качестве альтернативного материала, создан безникелевый титановый сплав. Несмотря на достойные механические свойства, биосовместимость данного сплава с клетками и тканями человека не изучалась. Целью работы является исследование биосовместимости сплава Ti20Nb10Ta5Zr с помощью клеточных культур. Материалы и методики. Объектом исследования были пластинки из Ti, NiTi и Ti20Nb10Ta5Zr размерами 20 x 20 x 1 мм. Для исследования *in vitro* в качестве клеточных моделей использовали культуру клеток человеческой нейробластомы SH-SY5Y. На поверхность образцов помещали клетки в концентрации 104 кл/см², в объеме 3 мл на чашку. Культивирование клеток на образцах проводили в течение 3 суток. Для определения количества живых/не живых клеток использовали окраску клеток флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (Sigma, USA) – 2 мкг/мл и йодидом пропидия (Sigma, USA) – 2 мкг/мл. Первый краситель окрашивает все клетки, для их идентификации. Второй – только мертвые, так как его скорость окраски значительно ниже при целой плазматической мембране. После проводили микроскопический анализ образцов с использованием имидж-системы на базе Leica DMI6000 (Leica, Germany). Для анализа подсчитывали не менее 500 клеток на поверхности образца. Результаты. Число нежизнеспособных клеток для Ti, NiTi, Ti20Nb10Ta5Zr составляло 3,9%, 5,5% и 1,9%, соответственно (рис.3.). Таким образом, при культивировании клеток на сплаве TiNbTaZr наблюдается наименьшее количество нежизнеспособных клеток, при чем разница с NiTi составляет почти три раза.

Число нежизнеспособных клеток для Ti, NiTi, Ti20Nb10Ta5Zr составляло 3,9%, 5,5% и 1,9%, соответственно (рис.3.). Таким образом, при культивировании клеток на сплаве TiNbTaZr наблюдается наименьшее количество нежизнеспособных клеток, при чем разница с NiTi составляет почти три раза.

Работа выполнена при поддержке при поддержке Минобрнауки России (идентификатор субсидии RFMEFI60417X0196).

Литература:

1. Elena O. Nasakina, Mikhail A. Sevostyanov, Alexander S. Baikin, Sergey V. Konushkin, Konstantin V. Sergienko, Mikhail A. Kaplan, Ilya M. Fedyuk, Alexander V. Leonov, Alexey G. Kolmakov. *Using of magnetron sputtering for biocompatible composites creating // Metal Matrix Composites / Book edited by Dr. Dumitra Lucan* (ISBN 978-1-78984-130-5) – Croatia, Rijeka: IN TECH d.o.o., 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79609
2. E.O. Nasakina, S.V. Konushkin, M.I. Baskakova, I.M. Fedyuk, K.V. Sergienko, A.S. Baikin, M.A. Kaplan, M.A. Sevostyanov, A.G. Kolmakov. *The Production of a Thin Wire of Ti-Nb-Ta-Zr Shape Memory Alloy for Medical Devices // J Material Sci Eng (Journal of Material Sciences & Engineering) 2018, Volume 7, Issue 1, 430-436* DOI: 10.4172/2169-0022.1000430

UDC 57.084.1

COMPARATIVE EVALUATION OF BIOSAFETABILITY OF TITANIUM AND TITANIUM ALLOYS WITH MEMORY EFFECT OF THE FORM IN VITRO

Sergienko K.V., Konushkin S.V., Bepamiatnova A.

IMET RAS, RF, 119334, Moscow, Leninsky pr., 49
e-mail: shulf@yandex.ru

Today, many biocompatible metallic, ceramic, and composite materials are known, but the search for more functional and safe materials continues, which gradually opens up new treatment options and, consequently, improves the

quality of life for patients. A modern group of materials for vascular implants is alloys with SME and superelasticity. Its main representative can be called nickel titanium. However, this alloy has a clear disadvantage in the form of a high content of potentially toxic and allergenic metal - nickel. As an alternative material, nickel-free titanium alloy was created. Despite decent mechanical properties, the biocompatibility of this alloy with human cells and tissues has not been studied. The aim of the work is to study the biocompatibility of the Ti20Nb10Ta5Zr alloy using cell cultures.

Key words: biocompatibility, titanium, titanium alloys

Titanium and its alloys are also widely used in medical practice. The paper presents a comparative assessment of in vitro biocompatibility of Ti, NiTi, TiNbTaZr.

Introduction. Today, many biocompatible metallic, ceramic, and composite materials are known, but the search for more functional and safe materials continues, which gradually opens up new treatment options and, consequently, improves the quality of life for patients. A modern group of materials for vascular implants is alloys with SME and superelasticity. Its main representative can be called nickel titanium. However, this alloy has a clear disadvantage in the form of a high content of potentially toxic and allergenic metal - nickel. As an alternative material, nickel-free titanium alloy was created. Despite decent mechanical properties, the biocompatibility of this alloy with human cells and tissues has not been studied. The aim of the work is to study the biocompatibility of the Ti20Nb10Ta5Zr alloy using cell cultures. **Materials and techniques.** The object of the study were plates of Ti, NiTi and Ti20Nb10Ta5Zr with dimensions of 20 x 20 x 1 mm. For in vitro studies, cell culture of human neuroblastoma SH-SY5Y was used as a cell model. Cells were placed on the surface of the samples at a concentration of 104 cells / cm², in a volume of 3 ml per dish. Cultivation of the cells on the samples was carried out for 3 days. To determine the number of live / non-living cells, the red nuclei were used with Hoechst 33342 fluorescent dyes (Sigma, USA) - 2 µg / ml and propidium iodide (Sigma, USA) - 2 µg / ml. The first dye stains all cells to identify them. The second - only the dead, as its color rate is much lower with the whole plasma membrane. After a microscopic analysis of the samples was carried out using an image system based on Leica DMI6000 (Leica, Germany). For analysis, at least 500 cells on the sample surface were counted. **Results.** The number of non-viable cells for Ti, NiTi, Ti20Nb10Ta5Zr was 3.9%, 5.5% and 1.9%, respectively (Fig. 3.). Thus, when cells are cultivated on the TiNbTaZr alloy, the smallest number of non-viable cells is observed, and the difference with NiTi is almost three times.

The number of non-viable cells for Ti, NiTi, Ti20Nb10Ta5Zr was 3.9%, 5.5% and 1.9%, respectively (Fig. 3.). Thus, when cells are cultivated on the TiNbTaZr alloy, the smallest number of non-viable cells is observed, and the difference with NiTi is almost three times.

The work was carried out according to the task subsidy № RFMEFI60417X0196.

References:

1. Elena O. Nasakina, Mikhail A. Sevostyanov, Alexander S. Baikin, Sergey V. Konushkin, Konstantin V. Sergienko, Mikhail A. Kaplan, Ilya M. Fedyuk, Alexander V. Leonov, Alexey G. Kolmakov. Using of magnetron sputtering for biocompatible composites creating // *Metal Matrix Composites / Book edited by Dr. Dumitra Lucan* (ISBN 978-1-78984-130-5) – Croatia, Rijeka: IN TECH d.o.o., 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79609
2. E.O. Nasakina, S.V. Konushkin, M.I. Baskakova, I.M. Fedyuk, K.V. Sergienko, A.S. Baikin, M.A. Kaplan, M.A. Sevostyanov, A.G. Kolmakov. The Production of a Thin Wire of Ti-Nb-Ta-Zr Shape Memory Alloy for Medical Devices // *J Material Sci Eng (Journal of Material Sciences & Engineering)* 2018, Volume 7, Issue 1, 430-436 DOI: 10.4172/2169-0022.1000430

УДК: 66.017, ББК: 35.10

ТЕРМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРНЫХ НАНОКОМПОЗИТОВ, АРМИРОВАННЫХ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

Перова А.Н., Хватов А.В., Ломакин С.М.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Россия, 119334, Москва, Косыгина, 4
e-mail: aleksandra.perova1994@mail.ru

Наноккомпозиты на основе нанокцеллюлозы благодаря их доступности и многообразным свойствам использовались в различных сферах применения. Этот материал экологически безопасен, имеет низкую плотность, высокую прочность на растяжение, модуль упругости и может быть получен в больших количествах по низкой цене. Однако низкая термическая стабильность может ограничить использова-

ние наноцеллюлозы и композитов на ее основе при высоких температурах. Поэтому для определения максимальной рабочей температуры при производстве и эксплуатации материала необходима оценка его термических свойств.

Ключевые слова: наноцеллюлоза, нанокompозиты целлюлозы, полимерные нанокompозиты

Наноцеллюлозные структуры привлекли внимание в качестве потенциального материала для армирования нанокompозитов. Благодаря введению этих наноразмерных компонентов в полимерную матрицу даже в небольших количествах свойства полимеров улучшаются, однако это зависит от типа используемой наноцеллюлозы. Полимерные нанокompозиты, наполненные наноцеллюлозой, представляют собой новый класс материалов, альтернативных обычным наполненным полимерам, и обладают некоторыми чрезвычайно интересными свойствами, такими как высокая прочность и жесткость в сочетании биоразлагаемостью, возобновляемостью и низкой массой. Принимая во внимание природу наноцеллюлозных наполнителей, их нанокompозиты могут найти широкое применение в качестве медицинских материалов [1]. Для того чтобы использовать наноцеллюлозу в качестве армирующего агента в нанокompозитах, сильные водородные связи между молекулами наноцеллюлозы, которые делают ее гидрофильной, должны быть разрушены для хорошего распределения в полимерах с гидрофобной природой. Поверхностная модификация является наиболее распространенным способом придания поверхности наноцеллюлозы гидрофобных свойств и ее однородного включения в различные полимеры [2]. Следовательно, для сохранения этого естественного распределения наночастиц в первых работах по получению полимерных нанокompозитов, армированных наноцеллюлозой, включали водную среду. Такой режим обработки позволяет сохранить обособленное состояние наночастиц в результате их коллоидного распределения в воде. Поэтому водорастворимые полимеры или полимерные водные дисперсии (латекс) продолжают оставаться подходящими системами для такого применения [3].

Более удобным способом приготовления термопластичных полимерных нанокompозитов, армированных наноцеллюлозой, является экструзионная переработка в расплаве. Этот метод можно рассматривать как «зеленый» процесс, поскольку в нем не используется растворитель. Однако несовместимость гидрофильной целлюлозы и гидрофобной полимерной матрицы, а также недостаток термической стабильности являются основными проблемами этой процедуры. Технология обработки в расплаве, используемая для изготовления нанокompозита целлюлозы, зависит от термических свойств выбранной полимерной матрицы и наноцеллюлозы. Чтобы избежать нежелательного разложения полимера и наполнителя в процессе приготовления, температуры обработки должны контролироваться. Кроме того, межфазное взаимодействие между матрицей и наноцеллюлозой влияет на свойства изготовленных нанокompозитов и процесс производства.

В настоящей работе термические свойства композитов полиэтилена низкой плотности (ПЭНП)/наноцеллюлоза (НЦ), полученных растворением в ксилоле, были изучены с помощью термогравиметрического (ТГА) анализа. На основании результатов ТГА в инертной среде аргона установлено, что присутствие армирующего агента НЦ не оказало существенного влияния на температуры разложения композитов ПЭНП/НЦ по сравнению с исходным ПЭНП. Однако НЦ способствует снижению температуры разложения нанокompозитов на воздухе. С другой стороны, конечная стадия термоокислительной деструкции нанокompозитов значительно отличается от исходного ПЭНП из-за внутримолекулярных радикальных процессов карбонизации, вызванных НЦ.

В настоящей работе термические свойства композитов ПЭНП/НЦ, полученных растворением в ксилоле, были изучены с помощью ТГА. На основании результатов ТГА в инертной среде было установлено, что присутствие НЦ не оказало существенного влияния на температуры начала разложения композитов ПЭНП/НЦ по сравнению с чистым ПЭНП. Однако, на воздухе НЦ снижает температуру разложения композитов, а конечная стадия термоокислительной деструкции нанокompозитов значительно отличается от конечной стадии исходного ПЭНП из-за внутримолекулярных радикальных процессов карбонизации, промотируемых НЦ.

Работа выполнена за счет субсидии, выделенной на выполнение государственного задания, № гос. регистрации 0120125305.

Литература:

1. I. Siro, and D. Plackett., *Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review*, *Cellulose* 17, pp. 459 – 494 (2010).
2. *Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites*, Edited by H. Kargarzadeh, I. Ahmad, S. Thomas, and Alain Dufresne, 2017, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 918 p.
3. Dufresne A. *Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2017, 29, 1-8.

THERMAL PROPERTIES OF THE NANOCELLULOSE REINFORCED POLYMER NANOCOMPOSITES

Perova A.N., Khvatov A.V., Lomakin S.M.

*N.M. Emanuel Institute of biochemical physics Russian academy of sciences, Russia, 119334, Moscow, Kosygin, 4
e-mail: aleksandra.perova1994@mail.ru*

Nanocomposites based on nanocellulose have been used in various applications owing to their availability and diverse properties. This material is environmentally friendly and can be produced in large quantities at low cost and has a low density, high tensile strength, and modulus. However, the low thermal stability may limit the use of nanocellulose and manufacturing of its composites at high temperatures. An evaluation of the thermal properties is therefore essential for determining the maximum service temperature for manufacturing and usage.

Key words: nanocellulose; cellulose nanocomposites; polymer nanocomposites

Nanocellulose structures have attracted attention as a potential material in reinforced nanocomposites. By inserting these nanoscale compounds into polymers even in small quantities, the properties of polymers improve; however, it depends on the type of nanocellulose used in the applications. Polymer nanocomposites filled with nanocellulose represent a new class of material alternative to conventional filled polymers and possess some extremely interesting properties such as high strength and stiffness combined with low weight, biodegradability and renewability. Assuming the nanocellulose filler's nature the nanocomposites can find broad application as medical materials [1].

In order to use nanocellulose as reinforcement in nanocomposites, the strong hydrogen bonds between nanocellulose molecules, which make it hydrophilic, must be broken down for good dispersion in the polymers with hydrophobic nature. Surface modification is the most common way to make the surface of nanocellulose hydrophobic and to incorporate it homogeneously in different polymers. [2].

The first works on the preparation of nanocellulose reinforced polymer nanocomposites consequently involved an aqueous medium to keep this natural dispersion of the nanoparticles. This mode of processing allows preserving the individualization state of the nanoparticles resulting from their colloidal dispersion in water. Water-soluble polymers or polymer aqueous dispersions (latex) are therefore and continue to be favorable systems for such application [3].

However, the most convenient processing method for cellulose nanomaterial reinforced thermoplastic polymer nanocomposites is melt processing such as extrusion or injection-molding. This method can be considered as a green process since no solvent is involved. However, the incompatibility between hydrophilic cellulose and hydrophobic polymer matrix, as well as thermal stability issues are there the major problems of this procedure.

The melt processing technique used for cellulose nanocomposite fabrication depends on the thermal properties of the selected polymer matrix and the nanocellulose. In order to avoid unacceptable degradation of the polymer and the filler during the preparation process the processing temperatures should be controlled. In addition, the interfacial attraction between the matrix and the nanocellulose affects the properties of the fabricated nanocomposites and the production process.

In the present work the thermal properties of low density polyethylene (LDPE)/nanocellulose (NC) composites prepared by solution processing in xylene were evaluated using thermogravimetric (TGA) analysis. Based on the TGA results in argon the decomposition temperatures of LDPE/NC composites were not significantly affected by the presence of NC reinforcement when compared to neat LDPE. However, the NC seems to have a decreasing trend of decomposition temperature of nanocomposites in air. On the other hand, the final stage of the thermal-oxidative degradation of the nanocomposites considerably differs from initial LDPE due to the intramolecular radical processes of carbonization promoted by NC.

The work was funded by the state contract no.0120125305.

References:

1. I. Siro, and D. Plackett., *Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review*, *Cellulose* 17, pp. 459 – 494 (2010).
2. *Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites*, Edited by H. Kargarzadeh, I. Ahmad, S. Thomas, and Alain Dufresne, 2017, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 918 p.
3. Dufrence A. *Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2017, 29, 1-8.

УДК 57.085.23

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРЕХ КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Васильева С.А.,¹ Коровина Д.Г.,¹ Легонькова О.А.,² Савченкова И.П.¹

¹Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук, Москва, Россия

109428, Москва, Рязанский проспект, д. 24, корпус 1

e-mail: s.vasileva89@yandex.ru

²Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

Протестированы три коммерческих препарата, обладающих регенеративными свойствами. Показаны наилучшие результаты по жизнеспособности перевиваемых эмбриональных фибробластов под действием сшитой гиалуроновой кислоты.

Ключевые слова: сшитая гиалуроновая кислота; ПЭГ-400/ПЭГ-1500; полиакрилаты; токсикологический анализ *in vitro*; перевиваемые эмбриональные фибробласты.

Одной из главных задач токсикологии является развитие методов альтернативных опытам с использованием животных. В связи с этим активно развиваются и внедряются анализы токсичности *in vitro*. Однако до сих пор остается нерешенным вопрос проекции полученных эффектов химических веществ на сложный организм. Представляло интерес провести «обратный» токсикологический анализ – анализ цитотоксичности готового коммерческого препарата в культуре клеток.

В качестве культуры клеток были использованы перевиваемые эмбриональные фибробласты. Фибробласты высевали в 96-луночный планшет в плотности 8×10^3 кл./лун. Через 24 ч клетки формировали монослой с плотностью 70 %, питательную среду заменяли на среду для культивирования, содержащую исследуемые препараты в концентрации 50 % от объема среды. В качестве исследуемых препаратов были использованы: сшитая гиалуроновая кислота; ПЭГ-400/ПЭГ-1500; полиакрилаты. Исследование проводилось в трех повторах, контролем служили клетки, культивируемые в стандартных условиях без добавления препаратов. Анализ культуры проводили через 24 ч после добавления препаратов. Морфологическую характеристику нативных препаратов проводили визуально на инвертированном микроскопе. Оценку жизнеспособности осуществляли с помощью автоматического счетчика Luna-II (Logos Biosystems, Корея). После экспозиции с препаратами фибробласты подвергли дальнейшему культивированию в течение 9 сут в стандартной питательной среде для дополнительной оценки цитотоксичности.

Исследование цитотоксичности гиалуроновой кислоты *in vitro* показало высокую биологическую совместимость и пролиферацию фибробластов. Жизнеспособность после 24 ч культивирования составила $95,89 \pm 4,08$ %, плотность монослоя достигла 100 %, визуальная оценка выявила гомогенность клеточной культуры. После смены среды с препаратом на обычную питательную среду клетки сохраняли более высокую скорость образования монослоя, по сравнению с контролем. Фибробласты под действием препарата, состоящим из ПЭГ-400/ПЭГ-1500, приобрели округлую форму, включения и зернистость в цитоплазме отсутствовали, а жизнеспособность через 24 ч экспозиции составила $25,17 \pm 3,41$ %. После смены среды жизнеспособность клеток осталась на низком уровне, округлая форма сохранилась. Изменения в культуре фибробластов были выявлены и при обработке его полиакрилатами: в цитоплазме выявлена зернистость, было отмечено усиление адгезии клеток к пластику. Препарат обладал высокой цитотоксичностью, однако на 9 сут после смены среды на стандартную питательную среду культура фибробластов оставалась жизнеспособной, клетки пролифелировали. В процессе экспозиции фибробласты округлились, после удаления препарата форма клеток стала распластанной, некоторые клетки приобрели вытянутую форму.

Полученные результаты будут использованы для дальнейшего исследования и совершенствования методов анализа цитотоксичности разрабатываемых препаратов, а также при планировании дальнейших исследований в изучаемой области.

UDC 57.085.23

TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF THREE COMMERCIAL DRUGS IN CELL CULTURE

Vasileva S.A.,¹ Korovina D.G.,¹ Legon'kova O.A.,² Savchenkova I.P.¹

¹Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia
109428, Moscow, Ryazansky prospect, 24, b. 1
e-mail: s.vasileva89@yandex.ru

²Vishnevskii Institute of Surgery, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Three commercial drugs with regenerative properties have been tested. The best results on the viability of continuous cell line of embryonic fibroblasts under the action of cross-linked hyaluronic acid are shown.

Key words: cross-linked hyaluronic acid; PEG-400/PEG-1500; polyacrylates; toxicological analysis *in vitro*; continuous cell line of embryonic fibroblasts.

One of the main tasks of toxicology is the development of alternative methods to experiments using animals. In this regard, *in vitro* toxicity tests are being actively developed and implemented. However, the question of projection of the resulting effects of chemicals on a complex organism remains unresolved. It was interesting to conduct a "reverse" toxicological analysis – analysis of cytotoxicity of the commercial off-the-shelf drug in cell culture.

Continuous cell line of embryonic fibroblasts was used as a cell culture. Fibroblasts were seeded in 96-well plates at a density of 8×10^3 cells per well. After 24 hours cells formed a monolayer with a density of 70 %, culture medium was replaced with culture medium containing the study drugs in a concentration of 50 % by volume of the medium. As the test drugs were used: cross-linked hyaluronic acid; PEG-400/PEG-1500; polyacrylates. The study was conducted in triplicate, the control was the cells cultivated in standard conditions without adding drugs. The analysis of culture was performed 24 hours after the addition of drugs. The morphological characteristic of native samples was performed visually using an inverted microscope. Cell viability was assessed using the Luna-II automatic counter (Logos Biosystems, Korea). After exposure with drugs, fibroblasts were further cultivated for 9 days in a standard culture medium for additional assessment of cytotoxicity.

The study of cytotoxicity of hyaluronic acid *in vitro* showed high biological compatibility and high proliferation of fibroblasts. The cell viability after 24 hours of culturing was $95,89 \pm 4,08$ %, the density of the monolayer reached 100 %, the visual assessment revealed the homogeneity of the cell culture. After changing the medium with the drug to the normal culture medium, the cells maintained a higher rate of monolayer formation compared to control. Fibroblasts under the action of the drug consisting of PEG-400/PEG-1500 acquired a rounded form, inclusions and granularity in cytoplasm were absent, and cell viability after 24 hours of exposure was $25,17 \pm 3,41$ %. After changing the medium, cell viability remained low, the rounded form was preserved. Changes in the fibroblast cell culture were also identified when treating it with polyacrylates: granularity was detected in the cytoplasm, increased adhesion of cells to plastic was noted. The drug had high cytotoxicity, but on 9 days after changing the medium to the standard culturing medium, the fibroblast cell culture remained viable, cells proliferated. In the process of exposure, the fibroblasts were rounded, after removal of the drug, the shape of the cells became flattened, some cells became elongated.

The results will be used for further research and improvement of methods of analysis of cytotoxicity of developed drugs, as well as planning of further researches in the fields of study.

УДК 619:615.9:612

УГЛЕРОДНЫЕ СОРБЕНТЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГИДРОКСИКИСЛОТАМИ, С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ И ПРОТИВОГРИБКОВЫМИ СВОЙСТВАМИ

Пьянова Л.Г.^{1,3}, Герунова Л.К.², Делягина М.С.¹, Лавренев В.А.^{1,3}, Седанова А.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем переработки углеводов Сибирского отделения Российской академии наук, Омск, Россия
644040, г. Омск-40, ул. Нефтезаводская, 54
e-mail: medugli@ihcp.ru; medugli@rambler.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение Высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»
644122, г. Омск, ул. Октябрьская, 92
e-mail: gerliud@mail.ru; vsed@mail.ru

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный технический университет» (ОмГТУ), г. Омск, Россия

Получены новые углеродные сорбенты, модифицированные гидроксикислотами, проявляющие антибактериальные и противогрибковые свойства. Изучены их физико-химические свойства и биологическая активность.

Ключевые слова: углеродные сорбенты, модифицирование, ветеринария, медицина, физико-химические свойства, биологическая активность.

Пористые углеродные сорбенты эффективно применяются для детоксикации организма в медицине и ветеринарии. Модифицированием поверхности можно повысить адсорбционные свойства углеродных сорбентов по отношению к токсичным соединениям. Варьируя количество функциональных групп, их химическую природу, можно направленно влиять на физико-химические свойства и биологическую активность углеродных сорбентов, открывая при этом новые сферы их применения. Особый интерес представляют собой модифицированные углеродные сорбенты бифункционального действия, обусловленного структурой матрицы и свойствами нанесенных модификаторов.

Цель работы: получение модифицированных гидроксикислотами углеродных сорбентов, исследование их физико-химических свойств и биологической активности.

Впервые разработаны способы модифицирования поверхности углеродного сорбента олигомерами гликолевой, молочной кислот, а также их сополимером путем поликонденсации данных гидроксикислот, включающие пропитку сорбента водными растворами гидроксикислот или их смесью и продолжительную термообработку без использования катализаторов и органических растворителей, проявляющих токсичность. Установлено, что модификаторы распределены на углеродной поверхности локально в виде мелких полимерных частиц или полимерной пленки. Модифицированные сорбенты обладают высокими адсорбционными свойствами и селективностью по отношению к маркерам токсичных веществ. Сорбент, модифицированный олигомером молочной кислоты, проявляет селективность к красителю метиленовому синему и пестицидному препарату ивермектину, а сорбент, модифицированный олигомером гликолевой кислоты, - к красителю метаниловому желтому и желатину. Исследованы антибактериальные и противогрибковые свойства сорбентов.

Изучен процесс десорбции нанесенных модификаторов с поверхности сорбента. Показано, что контакт модифицированных сорбентов с физиологическим раствором в течение 30 суток сопровождается гидролизом сложноэфирных связей в закрепленных на поверхности углеродной матрицы цепях олигомеров гидроксикислот и снижением pH среды от 6,3 до 1,8, снижением количества нанесенных модификаторов в 1,1-4 раза и увеличения удельной площади поверхности сорбентов в 1,3-4,5 раза в зависимости от способа модифицирования. Количество образованных гидроксикислот составляет 7,1-7,6 мг/г сорбента. Это позволяет предполагать наличие пролонгированного действия у данных материалов.

Определение биологической активности модифицированных сорбентов показало, что они могут быть эффективно использованы в качестве антибактериальных препаратов, в частности, для лечения диарейного синдрома, отравлений животных пестицидами и заболеваний желудочно-кишечного тракта.

УДК 619:615.9:612

HYDROXYACID MODIFIED CARBON SORBENTS WITH ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL PROPERTIES

P'yanova L.G.^{1,3}, Gerunova L.K.², Delyagina M.S.¹, Lavrenov A.V.¹, Sedanov A.V.¹

¹Institute of Hydrocarbons Processing, SB RAS, Omsk, Russia

st. Neftezhavodskaya 54, Omsk, 644040

e-mail: medugli@ihcp.ru; medugli@rambler.ru

²Omsk State Agrarian University of P.A. Stolypin, Omsk, Russia, st. October 92,

644122, Omsk

e-mail: gerliud@mail.ru; vsed@mail.ru

³Omsk State Technical University, Omsk, Russia

644050, Mira pr. 11, Omsk

New carbon sorbents modified with hydroxy acids and exhibiting antibacterial and antifungal properties were obtained. Their physicochemical properties and biological activity were studied.

Key words: carbon sorbents, modification, veterinary medicine, medicine, physicochemical properties, biological activity.

Porous carbon sorbents are effectively used for detoxification of the body in medicine and veterinary medicine. By modifying the surface, the adsorption properties of carbon sorbents with respect to toxic compounds can be improved. By varying the number of functional groups, their chemical nature, it is possible to directly influence the physicochemical properties and biological activity of carbon sorbents, while opening up new areas of their application. Of particular interest are modified carbon sorbents of bifunctional action, due to the structure of the matrix and the properties of the applied modifiers.

The aim of the work was to obtain hydroxyl-modified carbon sorbents and to study their physicochemical properties and biological activity.

For the first time, methods have been developed for modifying the carbon sorbent surface with glycolic, lactic acid oligomers, as well as their copolymer by polycondensation of these hydroxy acids, including impregnating the sorbent with aqueous solutions of hydroxy acids or their mixture and prolonged heat treatment without the use of catalysts and organic solvents exhibiting toxicity.

It is established that the modifiers are distributed locally on the carbon surface in the form of small polymer particles or a polymer film. Modified sorbents have high adsorption properties and selectivity in relation to markers of toxic substances. The sorbent modified with lactic acid oligomer shows selectivity to the dye methylene blue and the pesticidal drug ivermectin, and the sorbent modified by the oligomer of glycolic acid to the dye methanil yellow and gelatin. The antibacterial and antifungal properties of sorbents were investigated.

The contact of the modified sorbents with a physiological solution for 30 days is accompanied by the hydrolysis of ester bonds in the chains of hydroxy acid oligomers fixed on the surface of the carbon matrix and a decrease in the pH from 6.3 to 1.8. In the process of desorption, the number of applied modifiers decreases by a factor of 1.1–4 and the specific surface area of sorbents increases by 1.3–4.5 times, depending on the modifying method. The number of hydroxyacids formed is 7.1–7.6 mg / g of sorbent. This suggests the presence of a prolonged action of these materials.

The determination of the biological activity of modified sorbents has shown that they can be effectively used as antibacterial drugs, in particular, for the treatment of diarrheal syndrome, animal poisoning with pesticides and diseases of the gastrointestinal tract.

УДК 669

ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЗНИКЕЛЕВОГО СПЛАВА ПАМЯТИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Баскакова М.И., Насакина Е.О., Конушкин С.В., Сергиенко К.В., Каплан М.А., Сударчикова М.А., Царева А.М., Устинова Ю.Н., Севостьянов М.А., Колмаков А.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия
119334 РФ г. Москва, Ленинский пр-т, 49
e-mail.ru: m.i.baskakowa@gmail.com

Проведены комплексные исследования структуры и механических свойств сплава памяти формы Ti-Nb-Ta-Zr в виде образцов различной конфигурации от слитков до проволоки диаметром 280 мкм.

Ключевые слова: титан, сверхэластичность, эффект памяти формы, биосовместимость.

Сплавы с эффектом памяти формы (ЭПФ) и сверхэластичностью являются сейчас наиболее интересными в эндоскопической имплантологии – при создании изделий типа «стент» и КАВА-фильтр. При эксплуатации и установке таких изделий в организме обеспечиваются меньшие разрушения самого имплантата и повреждение тканей. Наилучшим образом эти свойства проявляются у никелида титана, но в состав этого материала входит токсичный никель, способный влиять на окружающие ткани прямо с поверхности имплантата или выделяться в физиологические среды в результате коррозии, что ведет к разрушению изделия, и к поражению организма [1-3]. В то же время возможна разработка безникелевых сплавов с ЭПФ и сверхэластичностью.

Целью работы было получение и комплексные исследования безникелевого сплава памяти формы Ti-Nb-Ta-Zr в виде образцов различной конфигурации от слитков до проволоки диаметром 280 мкм.

Морфологию и послойный элементный состав (в т.ч с использованием поперечных шлифов) поверхности материалов, микроструктуру сечений исследовали на растровом электронном микроскопе (РЭМ) TESCAN VEGA II SBU, снабженном приставкой для энергодисперсионного анализа INCA Energy, на котором также проводили фрактографические исследования образцов, и электронном Оже-спектрометре JAMP-9500F фирмы JEOL в сочетании с ионным травлением при бомбардировке аргоном под углом 30°. Для определения фазового состава использовали рентгеновский дифрактометр «Ultima IV» фирмы «Ригаку» в CuK α - излучении. Фазовый анализ осуществлялся в программном комплексе PDXL с использованием базы данных ICDD. Механические свойства исследованных образцов определяли в условиях статического растяжения на механической 10 – тонной испытательной машине INSTRON 3382, со скоростью испытаний не более 2 мм/мин.

Заметно довольно равномерное распределение элементов по объему слитков, а также хорошее совпадение полученных величин концентраций металлов в сплаве с расчетными величинами, ожидаемыми на основании подобранных навесок шихтовых материалов. Отмечено, что равномерная структура получена для всех составов, до и после гомогенизирующего отжига. Слиткам присуща дендритная структура. Границы зерен после пластической деформации не протравливаются при микроструктурном анализе, что свидетельствует об отсутствии рекристаллизации (рис. 2). С учетом предыдущих исследований по созданию тонкой проволоки из сплавов памяти [1] были сделаны выводы о формировании наноструктуры. Морфология проволок любого состава после волочения проявляет высокую неоднородность, в т.ч. перемежаются 2 типа поверхности различного состава – наблюдаются участки с высоким содержанием углерода, предположительно оставшегося после волочения, и с высоким содержанием кислорода. После шлифовки поверхности возрастает ее однородность.

Отмечены высокие показатели прочности и пластичности тонкой проволоки. По результатам испытания в зависимости от обработки проволоки можно сделать вывод, что наилучшим образом на них влияют механическая обработка поверхности и отжиг в вакууме.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (идентификатор субсидии RFMEFI60417X0196).

Литература:

1. Насакина Е.О., Севостьянов М.А., Гольдберг М.А., Демин К.Ю., Баикин А.С., Гончаренко Б.А., Черкасов В.А., Колмаков А.Г., Заболотный В.Т. Долгосрочные коррозионные испытания наноструктурного нитинола состава (Ni – 55,91% (мас.), Ti – 44,03% (мас.)) в статических условиях. состав и структура до и после коррозии // Мате-

риаловедение. – 2014. – № 8. – С. 40-45.

2. Заболотный В.Т., Колмаков А.Г., Севостьянов М.А., Насакина Е.О. Совершенствование медицинских изделий для эндоваскулярных операций // Интеграл. – 2013. – № 4. – С. 42-45.

3. Насакина Е.О., Севостьянов М.А., Гончаренко Б.А., Леонова Ю.О., Колмаков А.Г., Заболотный В.Т. Методы исследования коррозионной стойкости медицинского сплава нитинол с эффектом памяти формы. Способы изменения коррозионной стойкости // Перспективные материалы. – 2014. – № 9. – С. 19-33.

UDC 669

CHARACTERISTICS OF NON-NICKEL SHAPE MEMORY ALLOY OF MEDICAL APPOINTMENT

Baskakova M.I., Nasakina E.O., Konushkin S.V., Sergienko K.V., Kaplan M.A., Sudarchikova M.A., Tsareva A.M., Ustinova Yu.N., Sevostyanov M .A., Kolmakov AG

*Baikov Institute of Metallurgy and Material Sciences, Moscow, Russia
119334 Moscow, Leninsky Prospect, 49
e-mail.ru: m.i.baskakowa@gmail.com*

Complex studies of the structure and mechanical properties of the shape memory alloy Ti-Nb-Ta-Zr in the form of samples of various configurations from ingots to a wire with a diameter of 280 microns were carried out.

Key words: titanium, super elasticity, shape memory effect, biocompatibility.

Alloys with shape memory effect (SME) and superelasticity are now the most interesting in endoscopic implantology - when creating products like "stent" and KAVA-filter. During operation and installation of such products in the body, less damage to the implant itself and tissue damage are provided. These properties are best manifested in nitinol, but this material contains toxic nickel that can affect the surrounding tissues directly from the implant surface or be released into physiological environments as a result of corrosion, which leads to destruction of the product and the body lesion [1- 3]. At the same time, it is possible to develop nickel-free alloys with SME and super elasticity.

The aim of the work was to obtain and comprehensive study a non-nickel shape memory alloy Ti-Nb-Ta-Zr in the form of samples of various configurations from ingots to a wire with a diameter of 280 microns.

The morphology and the layered elemental composition (including using transverse thin sections) of the material surfaces, the microstructure of the sections were examined on a scanning electron microscope (SEM) of TESCAN VEGA II SBU, equipped with an INCA Energy dispersive energy analyzer, which also conducted fractographic studies of the samples, and JEOL electronic Auger spectrometer JAMP-9500F in combination with ion etching when bombarded with argon at an angle of 30 °. To determine the phase composition, an X-ray diffractometer "Ultima IV" from the company "Rigaku" was used in CuK α radiation. The mechanical properties of the studied samples were determined under static tensile conditions on an INSTRON 3382 10-ton mechanical testing machine, with a test speed of no more than 2 mm / min.

The fairly uniform distribution of elements within ingot volume is noticeable, as well as the good agreement between the obtained values of the concentrations of metals in the alloy with the calculated values expected on the basis of selected weights of charge materials. It is noted that a uniform structure was obtained for all compositions, before and after homogenizing annealing. The ingots have a dendritic structure. The grain boundaries after plastic deformation are not etched by microstructural analysis, which indicates the absence of recrystallization (Fig. 2). Taking into account previous studies on the creation of thin wires from memory alloys [1], conclusions were made on the formation of nanostructures. The morphology of the wires of any composition after drawing exhibits high heterogeneity, incl. 2 interspersed types of surface of different composition - there are areas with a high carbon content, presumably remaining after drawing, and with a high oxygen content. After grinding the surface increases its uniformity.

High strength and ductility of a thin wire are noted. According to the results of the test, depending on the processing of the wire, it can be concluded that they are best influenced by mechanical surface treatment and annealing in vacuum.

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russia (subsidy identifier RFMEFI60417X0196).

References:

1. Nasakina E.O., Sevostyanov M.A., Goldberg M.A., Demin K.Yu., Baikin A.S., Goncharenko B.A., Cherkasov V.A., Kolmakov A.G., Zabolotny V.T. Dolgosrochnyye korrozionnyye ispytaniya nanostrukturnogo nitinola sostava (Ni – 55,91% (mas.), Ti – 44,03% (mas.)) v staticheskikh usloviyakh. sostav i struktura do i posle korrozii (Long-term corrosion tests of nanostructured nitinol composition (Ni – 55.91% (wt.), Ti – 44.03% (wt.)) Under static conditions. composition and structure before and after corrosion) // Materialovedeniye (Materials Science). - 2014. - № 8. - p. 40-45.
2. Zabolotny V.T., Kolmakov A.G., Sevostyanov M.A., Nasakina E.O. Sovershenstvovaniye meditsinskiykh izdeliy dlya endovaskulyarnykh operatsiy (Improvement of medical devices for endovascular operations) // Integral. - 2013. - № 4. - p. 42-45.
3. Nasakina E.O., Sevostyanov M.A., Goncharenko B.A., Leonova Yu.O., Kolmakov A.G., Zabolotny V.T. Metody issledovaniya korrozionnoy stoykosti meditsinskogo splava nitinol s efektom pamyati formy. Sposoby izmeneniya korrozionnoy stoykosti (Research methods of corrosion resistance of the medical alloy nitinol with shape memory effect. Ways to change the corrosion resistance) // Perspektivnyye materialy (Promising materials). - 2014. - № 9. - p. 19-33.

УДК 61.615.4; 61.615.26

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЙ ЦЕРИЯ

О.А. Легонькова, А.И. Коротаева, И.А. Чекмарева, С.А. Ухин, О.В. Паклина

ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России.
Москва, 117997, ул. Большая Серпуховская, д. 27
e-mail: Legonkova@ixv.ru

Проведены экспериментальные исследования в условиях *in vivo* по оценке влияния соединений церия различной концентрации на рубцовые ткани после ожоговой травмы.

Ключевые слова: нанодисперсный диоксид церия (НДЦ), хлорид церия (III), ожоговая травма, противовоспалительный эффект, рубцовая ткань.

Рынок современных раневых покрытий довольно велик, однако, по сей день не существует повязки, подходящей для лечения всех типов ран. Данный факт обусловлен фазами течения раневого процесса и их вариабельностью. Многолетний опыт консервативного лечения ран позволил определить свойства-признаки «идеальной повязки», такие как атравматичность, пролонгированность действия, способность к моделированию на ране, обеспечение бесконтактного визуального контроля за раной, отсутствие токсичного и местнораздражающего действия, устойчивость к стерилизационной обработке, а также комфорт и удобство применения [1, 2]. Основная роль в осуществлении перечисленных функций перевязочного средства принадлежит полимерной матрице [3, 4].

Богатое разнообразие перевязочных средств нового поколения привело к необходимости их систематизации по различным характеристическим признакам. Наиболее многочисленную группу составляют лечебные повязки с иммобилизованными биологически активными веществами (БАВ) [5].

Достижения в области нанобиотехнологии привели к получению нанодисперсного диоксида церия (НДЦ), обладающего уникальными биохимическими свойствами, благодаря которым данный материал способен выполнять функции некоторых энзимов – оксидоредуктаз, фосфатаз и пр. Такие неорганические наноматериалы получили название «нанозимы» и уже почти полвека активно исследуются с целью медико-биологического применения, в том числе при лечении ожоговых ран путем их нанесения на поверхность ожога в виде водных растворов (William W. Monafio).

Низкая токсичность нанодисперсного диоксида церия обеспечивает сравнительную безопасность его применения *in vivo*, что позволяет рассматривать данный материал как потенциальный лекарственный препарат для терапии ряда заболеваний – прежде всего онкологических и заболеваний, связанных с окислительным стрессом, в том числе возрастных патологий. Вместе с тем многие свойства, присущие нанокристаллическому диоксиду церия, до сих пор остаются практически не исследованными.

Биологическая активность водорастворимых соединений церия проявляется в способности ускорять пролиферацию человеческих фибробластов, ограничивать местный сепсис, воспаление и системную иммуносупрессию. Ионы церия ингибируют высвобождение гистамина в человеческих гранулоцитах путем блокирования кальций-зависимой АТФазы, а также эффективно ингибируют данный фермент в эпидермальных клетках Лангерганса, которые играют важную роль в atopической экземе и иммунной

реакции в коже [6, 7].

Результаты проведенных исследований *in vivo* на модели послеожоговой рубцовой ткани свидетельствуют о том, что соединения церия, как в нанодисперсной форме, так и в виде водорастворимой соли оказывают тканесохраняющий и противовоспалительный эффект, способствуют формированию более полноценного регенерата по сравнению с контролем. При этом способность к восстановлению тканей, прилежащих к ожоговому повреждению, улучшается.

Выявленный эффект проникновения соединений церия в клетки соединительной ткани предполагает дальнейшие исследования механизмов его влияния на стадии формирования и созревания послеожогового рубца.

Литература:

1. Назаренко, Г.И., Сугурова, И.Ю., Глянцев, С.П. Рана. Повязка. Большой Руководство для врачей и медсестер. Медицина. Москва. – 2002.
2. Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов. Материалы II межд. конф.. МЗ РФ, Москва. – 1995.
3. Y.M. Qin. J. of the Textile Institute, 92 (1). – 2001. – P. 127–138.
4. C. Hansson. Drugs and Aging, 11 (4). – 1997. – P. 271–284.
5. Современные подходы к разработке и клиническому применению эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов. Материалы IV межд. конф.. МЗ РФ, Москва. – 2001.
6. Liza L. Ramenzoni, Franz E. Weber, Thomas Attin and Patrick R. Schmidlin. Cerium Chloride Application Promotes Wound Healing and Cell Proliferation in Human Foreskin Fibroblasts // Materials 2017, – Vol. 10. – P. 573.
7. A.B.G. Lansdown, S.R. Myers, J.A. Clarke, P. O'Sullivan. A reappraisal of the role of cerium in burn wound management // Journal of wound care, - Vol. 12, - № 3, March 2003. – P. 113-120.

UDC 61.615.4; 61.615.26

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF CERIUM COMPOUND BIOMEDICAL PROPERTIES

O.A. Legon'kova, A.I. Korotaeva, I.A. Chekmareva, S.A. Ukhin, O.V. Paklina

National medical research center of surgery named after A.V. Vishnevsky of the Ministry of health of the Russian Federation
Moscow, 117997, B. Serpukhovskaya str., 27.
e-mail: Legonkova@ixv.ru

In vivo experimental studies to assess different concentrations cerium compounds effect on post-burn scar tissue were conducted.

Key words: nanodispersed cerium dioxide (NCD), cerium chloride (III), burn injury, anti-inflammatory effect, scar tissue

Modern wound coatings' market is quite large, however, to this day there is no bandage suitable for all types of wounds treatment. This fact is stipulated with wound process phases and their variability. Longtime conservative wound treatment experience allowed to define properties-characteristics of the "ideal dressing", such as atraumatic, prolongation of action, ability to wound modelling, providing contactless visual wound monitoring, no toxic and local irritating action, sterilization treatment stability, comfort and convenience application [1, 2]. The main role in implementation of these dressing agent belongs to polymer matrix [3, 4].

Rich variety of new generation dressings has led to their systematization in accordance with different characteristics. Therapeutic dressings with immobilized biologically active substances (BAS) is the most numerous group [5].

Advances in nanobiotechnology have led to production of nanodispersed cerium dioxide (NCD), which has unique biochemical properties and thanks to them the material is able to perform certain enzymes-oxidoreductase, phosphatase functions etc. Such inorganic nanomaterials have been called "nanozymes" and have been actively studied for almost half a century for medical and biological application, including burn wounds treatment by applying them in aqueous solution form to the burn surface (William W. Monafo).

Low toxicity of nanodispersed cerium dioxide provides comparative safety of its use *in vivo*, which allows us to consider this material as a potential drug for a number of diseases treatment – especially cancer and diseases associated with oxidative stress, including age-related pathologies. However, many cerium nanocrystalline dioxide properties are still largely unexplored.

Biological activity of water-soluble cerium compounds is manifested in acceleration of human fibroblasts

proliferation, limitation local sepsis, inflammation and systemic immunosuppression. Cerium ions inhibit histamine release in human granulocytes by blocking calcium-dependent ATPase, and effectively inhibit this enzyme in epidermal Langerhans cells, which play an important role in atopic eczema and immune response in the skin [6, 7].

The results of the *in vivo* research indicate that cerium compounds, both in the nanodisperse form and in the form of water-soluble salt, have a tissue-preserving and anti-inflammatory effects, provide formation of more complete regenerate compared to the control, while the regeneration ability of tissues adjacent to the primary burn injury is being improved.

The revealed effect of the penetration of cerium compounds into connective tissue cells suggests further surveys of the mechanisms of its influence on the stage of wound healing.

References:

1. Назаренко, Г.И., Сугурова, И.Ю., Глянцев, С.П. Рана. Повязка. Большой Руководство для врачей и медсестер. Медицина. Москва. – 2002.
2. Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов. Материалы II межд. конф.. МЗ РФ, Москва. – 1995.
3. Y.M. Qin. *J. of the Textile Institute*, 92 (1). – 2001. – P. 127–138.
4. C. Hansson. *Drugs and Aging*, 11 (4). – 1997. – P. 271–284.
5. Современные подходы к разработке и клиническому применению эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов. Материалы IV межд. конф.. МЗ РФ, Москва. – 2001.
6. Liza L. Ramenzoni, Franz E. Weber, Thomas Attin and Patrick R. Schmidlin. *Cerium Chloride Application Promotes Wound Healing and Cell Proliferation in Human Foreskin Fibroblasts* // *Materials* 2017, – Vol. 10. – P. 573.
7. A.B.G. Lansdown, S.R. Myers, J.A. Clarke, P. O'Sullivan. *A reappraisal of the role of cerium in burn wound management* // *Journal of wound care*, - Vol. 12, - № 3, March 2003. – P. 113-120.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ микроРНК

EXTRACELLULAR VESICLES AND CIRCULATING microRNA

1. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОСОМ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ НА РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ IN VITRO, Новокрещенова А.Н., Буторина Н.Н., Паюшина О.В., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И.	141
INFLUENCE OF EXOSOMES, DERIVED FROM DIFFERENT TISSUE SOURCES, ON REGENERATIVE PROCESSES IN VITRO, Novokreshchenova A., Butorina N., Payushina O., Sheveleva O., Domaratskaya E.	142
2. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И РАСТВОРИМЫЕ ФАКТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ИНГИБИРУЮТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ФИБРОБЛАСТОВ В МИОФИБРОБЛАСТЫ И СПОСОБСТВУЮТ РЕВЕРСИИ ЭТОГО ПРОЦЕССА, Н.А.Басалова, Г.Д.Сагарадзе, О.А.Григорьева, К.Ю.Кулебякин, Е.С.Новоселецкая, Р.Ю.Еремичев, М.С.Арбатский, Н.И.Калинина, А.Ю.Ефименко	143
EXTRACELLULAR VESICLES AND SOLUBLE FACTORS ISOLATED FROM THE SECRETOME OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS INHIBIT FIBROBLAST TO MYOFIBROBLAST DIFFERENTIATION AND PROMOTE ITS REVERSAL, N.Basalova, G.Sagaradze, O.Grigorieva, K. Kulebyakin, E.Novoseletskaia, R. Eremichev, M. Arbatsky, N.Kalinina, A.Efimenko	144
3. ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ А549, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИМИ МЕМБРАННЫМИ ЧАСТИЦАМИ – ЭКЗОСОМАМИ И МИКРОВЕЗИКУЛАМИ ЗДОРОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, Ю.И.Савиновская, А.А.Нуштаева, А.В.Савельева, В.В.Морозов, Е.В.Кулигина, В.А.Рихтер, Д.В.Семенов	146
GENE EXPRESSION ALTERATIONS IN LUNG ADENOCARCINOMA CELLS A549 INDUCED BY CIRCULATING EXOSOMES AND MICROVESICLES OF HEALTHY HUMAN BLOOD, Y.Savinovskaya, A.Nushtaeva, A.Savelyeva, V.Morozov, E.Kuligina, V.Richter, D.Semenov	147
4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ SCF-СОДЕРЖАЩИХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, Зубкова Е.С., Белоглазова И.Б., Евтушенко Е.Г., Копылов А.Т., Парфенова Е.В., Меньшиков М.Ю.	148
APPLICATION OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTORS FOR ENGINEERING SCF-CONTAINING EXTRACELLULAR VESICLES FROM MESENCHYMAL STROMAL CELLS, Zubkova E.S., Beloglazova I.B., Evtushenko E.G., Kopylov A.T., Parfyonova E.V., Menshikov M.Yu.	149
5. МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ЭКЗОСОМ ПРИ ДИССЕМИНИРОВАННОМ РАКЕ ЯИЧНИКОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ, Юнусова Н.В., Патышева М.Р., Замбалова Е.А., Молчанов С.В., Коломиец Л.А., Очиров М. О., Кондакова И.В.	150
EXOSOMAL METALLOPROTEINASES IN ADVANCED OVARIAN CANCER: PROSPECTS OF CLINICAL APPLICATION, Yunusova N.V., Patysheva M.R., Zambalova E.A., Molchanov S.V., Kolomiets L.A., Ochirov M.O., Kondakova I.V.	151
6. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ: СТАРЫЕ И НОВЫЕ ПОДХОДЫ, Штам Т.А., Самсонов Р.Б., Забегина Л.М., Ковальчук А.А., Забродская Я.А., Камышинский Р.А., Малек А.В.	152
METHODS OF ISOLATION OF EXTRACELLULAR MICROVESICLES FROM BIOLOGICAL FLUIDS: OLD AND NEW APPROACHES, Shtam T.A., Samsonov R.B., Zabegina L.M., Kovalchuk A.A., Zabrodskaya Ya.A., Kamyshinsky R.A., Malek A.V.	153
7. МУЛЬТИЛАМЕЛЛЯРНЫЕ ЛИПОСОМЫ, КАК ПЕРЕНОСЧИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, Алексеева О. М., Кременцова А. В., Кривандин А. В., Голощাপов А. Н., Ким Ю. А.	154
MULTILAMELLAR LIPOSOMES AS TRANSPORTERS OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES, Alekseeva O. M., Krementsova A. V., Krivandin A. V., Golochshapov A. N., Kim Yu. A.	155
8. РАЗРАБОТКА МАГНИТНЫХ ЛИПОСОМ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С РАЗЛИЧНОЙ АНИЗОМЕТРИЕЙ, Ванзаракшаева С.Ч., Власова К.Ю., Ле-Дейген И.М., Усвалиев А.Д., Головин Ю. И., Кабанов А.В., Клячко Н.Л.	156
THE DEVELOPMENT OF MAGNETIC LIPOSOMES-BASED IRON OXIDE NANOPARTICLES WITH DIFFERENT ANISOMERIA, Vanzarakshaeva S.Ch., Vlasova K.Yu., Le-Deygen I.M., Usvaliev A.D., Golovin Y.I., Kabanov A.V., Klyachko N.L.	157
9. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВОСПРОИЗВОДИМОГО ПОЛУЧЕНИЯ КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ ИПСК ЧЕЛОВЕКА, Коробко Е.С., Супруненко Е.А., Евтушенко Е.Г., Зубкова О.Н.	158

DEVELOPING THE PROTOCOL FOR REPRODUCIBLE PREPARATION OF THE CONCENTRATED EXTRACELLULAR VESICLE SAMPLES FROM hiPSC, Korobko E.S., Suprunenko E.A., Evtushenko E.G., Zubkova O.N.....	159
10. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ КОНДИЦИОННЫХ СРЕД И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ, Сомов А.К., Тутанов О.С., Проскура К.В., Штам Т.А., Григорьева А.Е., Юнусова Н.В., Рябчикова Е.И., Лактионов П.П., Тамкович С.Н.	160
COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXOSOMES OF CONDITIONAL MEDIA AND BIOLOGICAL FLUIDS, Somov A.K., Tutanov O.S., Proskura K.V., Stam T.A., Grigor'eva A.E., Yunusova N.V., Ryabchikova E.I., Laktionov P.P., Tamkovich S.N.....	161

УДК 57.085.23

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОСОМ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ НА РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ *IN VITRO*

Новокрещенова А.Н., Буторина Н.Н., Паюшина О.В., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
119334, Москва, ул. Вавилова, 26
e-mail: a.novokresh@mail.ru

В данной работе мы охарактеризовали экзосомы, получаемые от мезенхимальных стромальных клеток (МСК) разных тканей, и показали, что они способны подавлять фиброз и усиливать миогенез *in vitro*.

Ключевые слова: экзосомы, мезенхимальные стромальные клетки, *in vitro*, миогенез, регенерация

Недавно роль дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в регенерации тканей подверглась сомнению, и сегодня считается, что МСК способствуют заживлению в основном путем паракринного воздействия [1]. В секретоме МСК присутствуют экзосомы – внеклеточные везикулы, выполняющие сигнальную функцию за счет содержащихся в них белков и микроРНК и являющиеся перспективным ресурсом для терапии и диагностики. Целью нашей работы является характеристика экзосом, выделяемых МСК из разных тканевых источников, и исследование их влияния на регенерацию *in vitro*.

МСК выделяли из костного мозга, жировой ткани и здоровой и поврежденной мышечной ткани крыс породы Wistar. МСК культивировали в стандартных средах с добавлением инсулин-трансферрин-селенита (ITS) до достижения конфлюэнтного монослоя. Среда заменялась на бессывороточную за двое суток до сбора кондиционированных сред, из которых выделяли экзосомы методом ультрацентрифугирования. Методом NTA (nanoparticle track analysis) измеряли концентрации полученных частиц и их диаметр, методом Брэдфорда измеряли количество белка в экзосомах, а при помощи проточной цитометрии определяли наличие поверхностных маркеров экзосом. Влияние экзосом на регенерацию исследовали на моделях фиброза и миогенеза *in vitro*. Для моделирования фиброза добавляли TGFβ к культуре мышечных фибробластов, экзосомы добавляли разово в концентрациях 50 и 200 мкг/мл. Миогенез исследовали на культуре миоцитов из мышц крысят в возрасте 9 дней, экзосомы добавляли дважды, с интервалом с 2 дня, в концентрации 50 мкг/мл. В контрольные лунки экзосомы не добавляли.

По результатам NTA, диаметр полученных экзосом составил 119-130 нм. Концентрации экзосом варьировали между тканями и находились в пределах от $0,49 \cdot 10^{11}$ до $1,32 \cdot 10^{11}$ частиц/мл; максимальный выход был получен от МСК жировой ткани. Средние концентрации белка в экзосомах достигали 500-650 мкг/мл, а наибольшее количество белка было обнаружено в экзосомах, полученных от мышечных МСК. С помощью проточной цитометрии в образцах были выявлены тетраспанины CD63 и CD9 – одни из маркеров экзосом.

В модели фиброза *in vitro* исследовали изменения количества и морфологии фиброзных узелков. Было подтверждено, что высокие концентрации экзосом оказывают цитотоксический эффект: при добавлении 200 мкг/мл везикул наблюдали гибель клеток. Однако при добавлении 50 мкг/мл выявилось снижение количества фиброзных узелков и их уменьшение в размерах. Наилучший эффект оказали экзосомы здоровых мышц: количество узелков снизилось на 72,7%, и почти все узелки были мелкими (до 10 клеток).

Влияние экзосом на миогенез оценивали по количеству миотуб в культуре. Наибольшее количество миотуб образовалось под действием экзосом от МСК здоровых мышц - 94 ± 7 миотуб на лунку. Большинство миотуб были длинными и содержали от четырех ядер. Окружающие клетки при этом стали вытянутыми и

тонкими, в то время как клетки в контроле имели распластанную форму.

Таким образом, было показано, что экзосомы играют активную роль в процессах дифференцировки и фиброза и что их использование может способствовать активации процессов, связанных с регенерацией, *in vitro*. Наиболее эффективными оказались экзосомы, выделяемые МСК здоровых мышц. В ближайшее время будет исследовано действие экзосом на регенерацию мышц *in vivo* на модели пореза икроножной мышцы крыс.

Литература:

1. Furuta T. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. // *Stem Cells Transl. Med. Wiley-Blackwell*, 2016. Vol. 5, № 12. P. 1620–1630.

UDC 57.085.23

INFLUENCE OF EXOSOMES, DERIVED FROM DIFFERENT TISSUE SOURCES, ON REGENERATIVE PROCESSES IN VITRO

Novokreshchenova A., Butorina N., Payushina O., Sheveleva O., Domaratskaya E.

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119334, Moscow, Vavilova st., 26
e-mail: a.novokresh@mail.ru

In this work we have characterized exosomes, produced by mesenchymal stromal cells (MSC) from different tissues, and showed that they are able to reduce fibrosis and induce myogenesis *in vitro*.

Key words: exosomes, mesenchymal stromal cells, *in vitro*, myogenesis, regeneration

Recently the role of mesenchymal stem cell (MSC) differentiation in tissue repair has been questioned, and currently it is their paracrine influence that is considered to be the key agent in regeneration [1]. MSC secretome includes exosomes – extracellular vesicles that perform regulatory function in the organism, due to the proteins and miRNA that they transfer. Exosomes present great potential as a biological resource for therapy and diagnostics. The goal of our research is characterization of exosomes produced by MSCs derived from different tissues and evaluation of their effect on tissue regeneration *in vitro*.

MSCs were obtained from bone marrow, adipose tissue and healthy and injured muscle tissue of Wistar rats. MSCs were cultivated in standard media with addition of insulin-transferrin-selenium (ITS) until reaching confluent monolayer. Afterwards medium was changed for serum-free medium, two days prior to collection of conditioned medium, from which exosomes were retrieved by ultracentrifugation. Exosome characterization was performed using NTA (nanoparticle track analysis) to estimate the number of collected particles and their diameter, Bradford protein assay to quantify exosomal protein, and flow cytometry to confirm presence of external exosomal markers. Evaluation of exosome influence on tissue regeneration was carried out on fibrosis and myogenesis *in vitro* models. To model fibrosis, TGFβ was added to muscle fibroblast culture, and then exosomes were added once in 50 and 200 µg/ml concentrations. Myogenesis was studied on the culture of myoblasts, obtained from 9 day old rats muscle tissue, 50 µg/ml of exosomes were added to culture medium twice, with two days interval. Exosomes were not added to control wells.

According to NTA, the diameter of isolated exosomes is 119-130 nm. Concentrations of particles varied between tissue sources and range within $0,49 \cdot 10^{11}$ to $1,32 \cdot 10^{11}$ particles/ml; adipose tissue showed the maximal yield. Mean concentrations of exosomal protein reached 500-650 µg/ml, and the largest amount of protein was found in exosomes obtained from muscle MSCs. Flow cytometry revealed CD63 and CD9 tetraspanins - ones of the exosomal markers.

To estimate fibrosis *in vitro* we counted the number of fibrotic nodules and changes in their quantity and morphology. Firstly, we confirmed that high concentrations of exosomes have cytotoxic effect: adding vesicles in 200 µg/ml caused cell death. Adding 50 µg/ml of exosomes, however, induced reduction of fibrotic nodules in number and size. The most positive effect was shown by exosomes from healthy muscle MSC: the number of nodules went down by 72,7%, and nearly all nodules were small (up to 10 cells).

Exosomes' effect on myogenesis was estimated by the number of myotubes in the myoblast culture. The most myotubes were formed after adding exosomes from healthy muscle MSC - 94 ± 7 myotubes per well. Most myotubes were long and contained at least 4 nuclei. The surrounding cells also changed their shape and were mostly elongated and thin, while in control wells the cells had typical fibroblast morphology.

To summarize, we have shown that exosomes play an active role in the processes of cell differentiation and fibrosis and that their application may contribute to activation of regenerative processes *in vitro*. Exosomes derived from healthy muscle MSC proved to be the most effective. Our next step is to investigate the influence of exosomes on skeletal muscle regeneration *in vivo* on the model of rat *musculus soleus* laceration.

References:

1. Furuta T. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. // *Stem Cells Transl. Med. Wiley-Blackwell*, 2016. Vol. 5, № 12. P. 1620–1630.

УДК: 602.9:616-003.93, ББК: 28.05

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И РАСТВОРИМЫЕ ФАКТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ИНГИБИРУЮТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ФИБРОБЛАСТОВ В МИОФИБРОБЛАСТЫ И СПОСОБСТВУЮТ РЕВЕРСИИ ЭТОГО ПРОЦЕССА

Н.А.Басалова¹, Г.Д.Сагарадзе¹, О.А.Григорьева¹, К.Ю.Кулебякин², Е.С.Новоселецкая³, Р.Ю.Еремичев³, М.С.Арбатский⁴, Н.И.Калинина⁴, А.Ю.Ефименко⁵

¹Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т, 27/10

²Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, 27/1

³Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, Москва, Ломоносовский пр-т, 27/10

⁴Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, 27/1

⁵Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, Москва, Ломоносовский пр-т, 27/10

e-mail: info@irm.msu.ru

Показана способность внеклеточных везикул и растворимых факторов, выделенных из секретома МСК человека, ингибировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты и способствовать реверсии этого процесса.

Ключевые слова: секретом МСК, внеклеточные везикулы, фиброз

Регенерация ткани – комплексный процесс, представляющий скоординированные взаимодействия различных типов клеток и их микроокружения. Целью процесса репаративной регенерации является восстановление утраченной функции ткани или органа. Однако, после обширных повреждений или хронического воздействия повреждающих агентов результатом репарации часто является патологическое увеличение доли стромального компонента, или фиброз. Фиброз – это избыточное отложение белков внеклеточного матрикса (ВКМ) и формирование рубцовой ткани, обусловленное чрезмерной синтетической активностью и гиперпролиферацией миофибробластов и их основных предшественников, фибробластов, нарушающее нормальную функцию органов. Таким образом, для предотвращения потери функциональности ткани или восстановления ее нормальной архитектуры после фиброобразования, необходимо исследовать эффективные инструменты для подавления или реверсии фиброза.

Одним из способов ограничения фиброза может являться ремоделирование непосредственно ВКМ, а также подавление ключевых путей передачи сигнала, ассоциированных с профибротическими эффектами. Поэтому большой интерес представляют мезенхимные стромальные клетки (МСК), способные разрушать ВКМ посредством секреции множества матриксных металлопротеиназ, а также подавлять фиброгенез за счет действия паракринных факторов и внеклеточных везикул (ВВ), переносящих различные регуляторные микро-РНК (миРНК). Более того, некоторые миРНК, такие как miR-21, miR-29, являются мажорными в составе ВВ МСК и могут быть вовлечены в регуляцию фиброгенных процессов. Для выявления ключевых антифибротических механизмов МСК, были проанализированы свойства различных компонентов секретома МСК.

Для этого фракции, обогащенные растворимыми факторами (РФ) или ВВ выделяли из 2-дневной кондиционированной среды (КС-МСК) иммортализованной линии МСК человека (hTERT MSC) с помощью

ультрафильтрации. Подавление и гиперэкспрессию исследуемых миРНК получали с помощью трансфекции внеклеточных везикул коммерческим набором Exo-Fect™ Exosome Transfection и синтезированными нуклеиновыми кислотами (Qiagen). Способность выделенных РФ и ВВ влиять на фиброгенные процессы оценивали на *in vitro* модели TGFβ-индуцированной дифференцировки фибробластов кожи человека в миофибробласты. Компоненты КС-МСК добавляли одновременно с индукцией дифференцировки либо через 4 суток, когда фибробласты уже приобретали фенотип, присущий миофибробластам. Антифибротические свойства фракций КС-МСК исследовали с помощью иммуноцитохимического анализа (α-гладкомышечный актин, винкулин), метода ПЦР в реальном времени (коллаген I типа, фибронектин, α-гладкомышечный актин) и теста на контракцию коллагенового геля.

Нами было показано, что КС-МСК, обогащенная ВВ, ингибировала дифференцировку фибробластов в миофибробласты, как на морфологическом, так и на функциональном уровне. Стоит отметить, что добавление ВВ к уже дифференцированным миофибробластам приводило к их дедифференцировке. Для того, чтобы уточнить роль мажорных миРНК, регулирующих фиброз, проведено подавление экспрессии миРНК-21 и миРНК-29, а также смоделирована их гиперэкспрессия в составе ВВ. Так, подавление экспрессии миРНК-21 в составе ВВ приводило к уменьшению доли клеток с фенотипом миофибробластов в культуре, в то время как подавление экспрессии миРНК-29 увеличивало это число. В то же время, гиперэкспрессия исследуемых миРНК не вносила значимого вклада в способность ВВ ингибировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Также нами было обнаружено, что фракция, обогащенная РФ, имела сходный эффект, подавляя как дифференцировку фибробластов, так и стимулируя дедифференцировку миофибробластов, однако отличающийся меньшей стабильностью при воспроизведении экспериментов.

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что компоненты КС-МСК, как ВВ, так и РФ подавляют дифференцировку фибробластов в миофибробласты и способствуют реверсии этого процесса. По-видимому, влияние компонентов МСК на фиброз в значительной степени может быть опосредовано балансом между профиброгенными и антифиброгенными миРНК в составе секретируемых клетками ВВ.

Исследование проводилось с использованием биоматериалов из Национального банка-депозитария живых систем и при поддержке РФФИ (#18-015-00525).

Литература:

1. El Agha E. et al. Mesenchymal stem cells in fibrotic disease // *Cell Stem Cell*. – 2017. – Т. 21. – №. 2. – С. 166-177.
2. Ferguson S. W. et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view // *Scientific reports*. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 1430.
3. Hinz B. et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling // *The American journal of pathology*. – 2012. – Т. 180. – №. 4. – С. 1340-1355.
4. Wynn T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis // *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. – 2008. – Т. 214. – №. 2. – С. 199-210.

UDC: 602.9:616-003.93

EXTRACELLULAR VESICLES AND SOLUBLE FACTORS ISOLATED FROM THE SECRETOME OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS INHIBIT FIBROBLAST TO MYOFIBROBLAST DIFFERENTIATION AND PROMOTE ITS REVERSAL

N.Basalova¹, G.Sagaradze¹, O.Grigorieva¹, K. Kulebyakin², E.Novoseletskaia³, R. Eremichev³, M. Arbatsky⁴, N.Kalinina⁴, A.Efimenko⁵

¹Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Centre, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosov Ave., 27/10

²Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Lomonosov Ave., 27/1

³Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Centre, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119992, Moscow, Lomonosov Ave., 27/10

⁴Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Lomonosov Ave., 27/1

⁵Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Centre, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119992, Moscow, Lomonosov Ave., 27/10

e-mail: info@irm.msu.ru

The ability of extracellular vesicles and soluble factors isolated from human MSC secretome to inhibit fibroblast to myofibroblast differentiation and promote reversal of this process has been shown.

Key words: MSC secretome, extracellular vesicles, fibrosis

Tissue regeneration is a complex process representing coordinated interactions of various cell types and their microenvironment. The purpose of the reparative regeneration process is restoration of the normal function of a tissue or organ. However, after extensive damage or chronic exposure to damaging agents, the common result of repair is a pathological increase in the proportion of the stromal component, or fibrosis. Fibrosis is the excessive deposition of extracellular matrix proteins (ECM) and the formation of scar tissue, due to excessive synthetic activity and hyperproliferation of myofibroblasts and their main precursors, fibroblasts, disrupting the normal function of organs. Thus, in order to prevent the loss of tissue functionality or the restoration of its normal architecture after fibrosis, it is necessary to explore effective tools for suppressing or reversing fibrosis.

One of the ways to limit fibrosis may be direct remodeling of ECM, as well as the suppression of key signal of transduction pathways associated with profibrotic effects. Therefore, mesenchymal stromal cells (MSCs), which are capable of degrading ECM by secreting many matrix metalloproteinases, as well as inhibiting fibrogenesis due to the action of paracrine factors and extracellular vesicles (EV), carrying various regulatory micro-RNA (miRNA), are of great interest. Moreover, some miRNAs, such as miR-21, miR-29, are major within the EV-MSC and may be involved in the regulation of fibrogenic processes. To identify the key antifibrotic mechanisms of MSCs, the properties of various components of the MSC secretome were analyzed.

So the fractions enriched with soluble factors (SF) or EV were isolated from a 2-day conditioned medium (CM-MSC) of an immortalized human MSC line (hTERT MSC) using ultrafiltration. Suppression and overexpression of the studied miRNAs was obtained by transfecting EV with the commercial Exo-Fect™ Exosome Transfection kit and synthesized nucleic acids (Qiagen). The ability of isolated SF and EV to influence fibrogenic processes was evaluated on in vitro model of TGFβ-induced fibroblast to myofibroblast differentiation. The components of the CM-MSC were added simultaneously with the induction of differentiation or after 4 days, when the fibroblasts had already acquired the myofibroblasts' phenotype. The antifibrotic properties of the CM-MSC fractions were investigated using immunocytochemical analysis (α-smooth muscle actin, vinculin), real-time PCR (type I collagen, fibronectin, α-smooth muscle actin) and a collagen gel contraction test.

We have shown that CM-MSC enriched with EV inhibited fibroblast to myofibroblast differentiation, both at the morphological and functional levels. It should be noted that the addition of EV to differentiated myofibroblasts led to their dedifferentiation. In order to specify the role of major miRNAs that regulate fibrosis, miRNA-21 and miRNA-29 expression were suppressed, and their overexpression was modeled within EV. Thus, the suppression of the miRNA-21 expression in the EV led to a decrease in the proportion of cells with the myofibroblast phenotype in culture, while the suppression of the miRNA-29 expression increased this number. At the same time, overexpression of the studied miRNAs did not significantly influence the ability of the EV to inhibit fibroblast to myofibroblast differentiation. We also found that the fraction enriched with SF had a similar effect, suppressing both the fibroblast differentiation and stimulating the dedifferentiation of myofibroblasts, but being less stable when reproducing experiments.

Based on these data, we can conclude that the components of the CM-MSC, both EV and SF, suppress fibroblast to myofibroblast differentiation and promote the reversion of this process. Apparently, the effect of MSC components on fibrosis can be largely mediated by the balance between profibrogenic and antifibrogenic miRNAs in the composition of secreted EV.

The study was funded by RFBR grant #18-015-00525 and conducted using biomaterial collected within National depositary bank of living systems

References:

1. El Agha E. et al. Mesenchymal stem cells in fibrotic disease // *Cell Stem Cell*. – 2017. – T. 21. – №. 2. – C. 166-177.
2. Ferguson S. W. et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view // *Scientific reports*. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 1430.
3. Hinz B. et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling // *The American journal of pathology*. – 2012. – T. 180. – №. 4. – C. 1340-1355.
4. Wynn T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis // *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. – 2008. – T. 214. – №. 2. – C. 199-210.

УДК: 577.29, ББК: 28.070

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ А549, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИМИ МЕМБРАННЫМИ ЧАСТИЦАМИ – ЭКЗОСОМАМИ И МИКРОВЕЗИКУЛАМИ ЗДОРОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Ю.И. Савиновская, А.А. Нуштаева, А.В. Савельева, В.В. Морозов, Е.В. Кулигина, В.А. Рихтер, Д.В. Семенов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, ак. Лаврентьева, 8,
e-mail: yulya_savinovskaya@mail.ru

Получены препараты мембранных частиц крови человека. Исследовано влияние циркулирующих мембранных частиц крови человека на клетки аденокарциномы легких А549 методом высокоэффективного секвенирования РНК на платформе Illumina HiSeq 1500.

Ключевые слова: экзосомы, микровезикулы, клетки аденокарциномы легких человека А549, высокоэффективное секвенирование, экспрессия генов, NF-каппа-В

Экзосомы и микровезикулы представляют собой мембранные везикулы, выделяемые в жидкости организма, такие как кровь, молоко, слюна клетками различных тканей и органов. Внеклеточные везикулы способны переносить метаболиты, белки, липиды и нуклеиновые кислоты клеток-доноров к клеткам-реципиентам, модулируя в них различные физиологические и патологические процессы [1]. Развитие представлений о структуре и составе мембранных частиц биологических жидкостей организма закладывает основу для создания новых, современных диагностических и прогностических подходов, а также для таргетной доставки терапевтических соединений в клетки-мишени. Несмотря на интенсивные исследования мембранных частиц, механизмы действия мембранных частиц на раковые и немалигнизированные клетки еще недостаточно изучены [2].

Целью данного исследования является анализ влияния мембранных микро- и наночастиц крови здоровых доноров на жизнеспособность, пролиферацию и экспрессию генов в клетках аденокарциномы легких человека линии клеток А549.

Для выделения и очистки мембранных микро-наночастиц крови человека мы использовали метод последовательного центрифугирования при усилиях 1200g, 16 000g и серию ультрацентрифугирования при > 100 000g.

Жизнеспособность клеток аденокарциномы легких А549, инкубированных в присутствии мембранных частиц крови здоровых доноров, анализировали с помощью МТТ-теста. Было установлено, что препараты мембранных частиц крови здоровых доноров повышали метаболическую активность и жизнеспособность клеток А549 через 48 ($p < 0,05$) и 72 ($p < 0,001$) часа инкубации. Методом проточной цитометрии было установлено, что мембранные частицы крови не оказывали существенного влияния на пролиферацию и не индуцировали апоптотические изменения в клетках А549 после 24 часов инкубации.

Анализ изменений транскриптома клеток аденокарциномы легких человека А549 под действием мембранных частиц крови человека проведен с использованием метода высокоэффективного секвенирования. Установлено, что инкубация клеток А549 с препаратами мембранных частиц крови здоровых доноров через 6 ч приводит к активации генов и они остаются активированными через 12 и 24 часа. Эти гены контролируются транскрипционным фактором NF-каппа-В.

Гены вторичного ответа, которые были активированы после 24 часов инкубации клеток А549 с мембранными частицами крови человека, контролируются не только NF-каппа-В, но и множеством других факторов транскрипции, включая REST и SMC3.

Гены вторичного ответа участвуют в проапоптотическом процессе, метаболических путях, образовании эндоплазматического ретикула, а также в образовании эндосом и внеклеточных везикул.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что мембранные частицы крови взаимодействуя с клетками А549 на раннем этапе (6 ч), модулирует сигнальные каскады NF-каппа-В, 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. Вторичный ответ клеток аденокарциномы легких человека А549 на циркулирующие везикулы включает как

активацию сигнального пути NF-каппа-B, так и процессы, ведущие к секреции экзосом. 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 гранта РФФИ 16-04-01457.

Литература:

1. Bei Y., Yu P., Cretoiu D., Cretoiu SM., Xiao J. Exosomes-based biomarkers for the prognosis of cardiovascular diseases // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017. Vol. 998. P. 71–88.
2. Frydrychowicz M., Kolečka-Bednarczyk A., Madejczyk M., Yasar S, Dworacki G. Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non small cell lung cancer. // *Scand. J. Immunol*. 2014. P. 2–10.

UDC: 577.29

GENE EXPRESSION ALTERATIONS IN LUNG ADENOCARCINOMA CELLS A549 INDUCED BY CIRCULATING EXOSOMES AND MICROVESICLES OF HEALTHY HUMAN BLOOD

Y. Savinovskaya, A. Nushtaeva, A. Savelyeva, V. Morozov, E. Kuligina, V. Richter, D. Semenov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russia, 630090, Novosibirsk, pr. Lavrentieva, 8
e-mail: yulya_savinovskaya@mail.ru*

Purified preparations of membrane particles of human blood were obtained. The influence of human blood membrane-covered particles on lungs adenocarcinoma A549 cells by method of high-throughput RNA sequencing on the Illumina HiSeq 1500 platform was studied.

Key words: exosomes, microvesicles, lungs adenocarcinoma A549 cells, high- throughput sequencing, gene expression, NF- kappa-B

Exosomes and microvesicles are membrane vesicles secreted into the body fluids such as blood, milk, saliva by cells of various tissues and organs. Extracellular vesicles are capable to transfer metabolites, proteins, lipids and nucleic acids of donor cells to recipient cells, modulating in them various physiological and pathological processes[1]. The development of ideas about the structure and composition of membrane particles of biological body fluids lays the foundation for developing of new, modern diagnostic and prognostic approaches, as well as for the targeted delivery of therapeutic compounds to target cells. Despite intensive research of membrane particles, the mechanisms of membrane particles' action on cancerous and non-malignant cells are not yet well understood [2].

The purpose of this study is analysis the effect of membrane micro and nanoparticles of blood of healthy donors on the viability, proliferation and gene expression in human lungs adenocarcinoma of the A549 cell line.

For the isolation and purification of membrane micro-nanoparticles of human blood, we used the method of sequential centrifugation at 1200g, 16,000g and a series of ultracentrifugation at > 100,000g.

The viability of A549 lung adenocarcinoma cells incubated in the presence of membrane blood particles from healthy donors was analyzed with MTT-test.

It was determined that preparations of membrane blood particles of healthy donors increased the metabolic activity and viability of A549 cells through 48 (p <0.05) and 72 (p <0.001) hours of incubation. By flow cytometry it was established that the membrane blood particles had not significant effect on proliferation and had not induce apoptotic changes in A549 cells after 24 hours of incubation.

Analysis was conducted of changes in the transcriptome of human lungs adenocarcinoma A549 cells under the action of human blood membrane particles, using the method of high- throughput sequencing. It was established that the incubation of A549 cells with preparations of membrane blood particles of healthy donors through 6 hours leads to gene activation and they remain activated through 12 and 24 hours. These genes are controlled by the transcription factor NF-kappa-B.

Secondary response genes that were activated after 24 h of A549 cells treatment with human blood membrane particles are controlled not only by NF-kappa-B, but rather with the variety of other transcription factors, including REST and SMC3.

Secondary response genes are involved in pro-apoptotic process, metabolic pathways, endoplasmic reticulum formation as well as formation of endosomes and extracellular vesicles.

The obtained data allow us to conclude that the membrane blood particles interacting with the A549 cells at the

early stage (6 h) modulate the NF-kappa-B signaling cascades, which, in turn, causes large-scale changes in gene expression, DNA replication and repair, chromatin segregation and other processes associated with mitosis to 24 hours incubation of cells in a medium with particles. The secondary response of A549 human lung adenocarcinoma cells to circulating vesicles includes the activation of the NF-kappa-B signaling pathway, as well as the processes leading to the secretion of exosomes. The results can be used to create new means diagnostic and therapy of diseases using membrane structures - exosomes and microvesicles - of human blood.

This work was supported by Russian Foundation for Basic Research grant number 16-04-01457.

References:

1. Bei Y, Yu P, Cretoiu D, Cretoiu SM, Xiao J. Exosomes-based biomarkers for the prognosis of cardiovascular diseases // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017. Vol. 998. P. 71–88.
2. Frydrychowicz M., Kolecka-Bednarczyk A., Madejczyk M., Yasar S, Dworacki G. - structure, biogenesis and biological role in non small cell lung cancer. // *Scand. J. Immunol.* 2014. P. 2–10.

УДК 576.5

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ SCF-СОДЕРЖАЩИХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Зубкова Е.С.², Белоглазова И.Б.², Евтушенко Е.Г.¹, Копылов А.Т., Парфенова Е.В.^{1,2}, Меньшиков М.Ю.¹.

¹ МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ

² ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, РФ

121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

e-mail: cat.zubkova@gmail.com

Внеклеточные везикулы мезенхимальных стромальных клеток, генетически-модифицированных методом трансдукции адено-ассоциированным вирусом, могут быть использованы для доставки трансгенного белка в клетки сердца

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, протеомика, адено-ассоциированный вирус

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой ограниченные двуслойной мембраной наночастицы, секретируемые различными клетками и способные переносить низкомолекулярные соединения, белки и генетическую информацию, тем самым участвуя в межклеточной коммуникации. В последнее время они привлекают большое внимание в качестве инновационных средств доставки эффекторных веществ. Терапию с использованием ВВ все чаще называют "cell-free" по аналогии с клеточной терапией, которую она превосходит по ряду параметров: биобезопасность, стабильность конечного продукта и возможность использования немедленно после размораживания. Для усиления терапевтического эффекта ВВ модифицируют, загружая их различными веществами. Методы «загрузки» можно разделить на две категории: загрузка после выделения (электропорация, липофекция и др.) и загрузка при биогенезе путем генетической модификации клеток-продуцентов ВВ. Существует множество способов генетической модификации, но в случае первичных клеточных культур наиболее эффективными являются рекомбинантные вирусные векторы [1], среди которых особое внимание привлекают векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAB). AAB непосредственно не вызывает болезни человека или животных, вероятность его интеграции в геном очень мала по сравнению с ретровирусными или лентивирусными векторами, что сводит к минимуму риски инсерционного мутагенеза, в то же время AAB способен инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки [2]. В данной работе мы использовали вирус с гибридным капсидом AAB-DJ, кодирующий фактор стволовых клеток – SCF, для трансдукции мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани крысы. Из кондиционированных сред генетически-модифицированных и интактных клеток были получены ВВ методом серии последовательных центрифугирований. Препараты характеризовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии, анализа траекторий наночастиц (NTA), иммуно-окрашивания на маркерные белки и масс-спектрометрии. С помощью масс-спектрометрического протеомного анализа мы показали, что трансгенный SCF обнаруживается во ВВ, высвобождаемых генно-модифицированными МСК, кроме того был выявлен ряд белков характерных только для данных ВВ. Было показано, что флуоресцентно-меченные ВВ поглощаются клетками кардиосфер и прогениторными клетками сердца. Таким образом, с помощью трансдукции аденоассоциированным вирусным вектором,

можно получить генетически модифицированные МСК, секретирующие ВВ, содержащие трансгенный SCF. ВВ трансдуцированных МСК могут быть использованы для доставки трансгенного белка в клетки сердца. В дальнейшем планируется изучение биологических эффектов ВВ генетически модифицированных МСК. Полученные результаты могут стать основой для получения бесклеточного продукта для стимуляции регенеративных процессов в сердце.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-015-00430.

Литература:

1. Шевченко Е.К Макаревич П.И., Цоколаева З.И., Ратнер Е.И., Парфенова Е.В. Эффективная трансдукция стромальных клеток жировой ткани человека с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса// *Гены & Клетки.* - 2010.-№5(1).- С. 60-64
2. Daya S., Berns K.I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors// *Clin Microbiol Rev.* 2008. Vol 21(4). P. 583-93.

UDC 576.5

APPLICATION OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTORS FOR ENGINEERING SCF-CONTAINING EXTRACELLULAR VESICLES FROM MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Zubkova E.S.², Beloglazova I.B.², Evtushenko E.G.¹, Kopylov A.T., Parfyonova E.V.^{1,2}, Menshikov M.Yu¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

² FGBU "National Medical Research Center for Cardiology", Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia
121552, 3-d Cherepkovskaya 15a, Moscow
e-mail: cat.zubkova@gmail.com

Extracellular vesicles released by mesenchymal stromal cells, genetically-modified via transduction with adeno-associated virus, could potentially be used for transgenic proteins delivery into cardiac cells

Key words: extracellular vesicles, proteomics, adeno-associated viral vector

Extracellular vesicles (EVs) are nanoparticles produced by various cells and enclosed by a phospholipid membrane bilayer. They are able to deliver wide range of regulatory small molecules, proteins and genetic material and, thus participating in cell-to-cell communication. Therefore, they have attracted a great attention as innovative tool for effectors delivery. Therapy with EVs is increasingly referred to as "cell-free" therapy by analogy with cell therapy, which it surpasses in a number of parameters: biosafety, stability of the final product and the ability to use immediately after thawing. EVs can be modified to enhance their therapeutic capability by loading them with various factors. Methods of "loading" can be divided into two categories: loading after EVs purification (electroporation, lipofection, etc.) and encapsulating material during biogenesis as a result of genetic modification of cells secreting EVs. There are several different ways of genetic modification for primary cells transduction with recombinant viral vectors being the most applicable [1]. Among other viruses adeno-associated virus (AAV) vectors has attracted particular attention because it does not directly cause known disease in humans or animals, the probability of its genome integration is very small compared to retroviral or lentiviral vectors, which reduces the likelihood of insertional mutagenesis, in addition AAV have an ability to infect both nondividing and dividing cells [2]. In the present study rat adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells were infected with hybrid capsid AAV-DJ viral vector encoding a stem cell factor (SCF). Extracellular vesicles were isolated from both genetically-modified and intact MSC conditioned medium by ultracentrifugation and were characterized by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), Western-blot and mass spectrometry analysis. Using mass-spectrometry analysis, we identified SCF-peptides in the EVs released by AAV-modified MSC; we also detected several proteins to be specifically secreted in the EVs from SCF-expressing MSC. Moreover, we have shown that fluorescently labeled EVs are readily internalized by both cardiosphere-derived cells and cardiac progenitor cells. Thus, EVs containing transgenic SCF could be produced from AAV transduced MSCs. These EVs can be used to deliver transgenic protein into cardiac cells. Biological effects of EVs from genetically modified MSCs on various model are yet to be studied. In general, this approach could be the basis for producing a cell-free product to stimulate the regenerative processes in the heart.

The study was supported by Russian Foundation for Basic Research, grant №18-015-00430.

References:

1. Shevchenko E.K., Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Ratner E.I., Parfenova E.V. Effective transduction of Human adipose stromal cells by recombinant adeno-associated virus// *Genes & Cells* 2010. Vol 5(1). P. 60-64
2. Daya S., Berns K.I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors// *Clin Microbiol Rev.* 2008. Vol 21(4). P. 583-93.

УДК 618.11-006.6-037.612.015.13

МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ЭКСОСОМ ПРИ ДИССЕМИНИРОВАННОМ РАКЕ ЯИЧНИКОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Юнусова Н.В., Патышева М.Р., Замбалова Е.А., Молчанов С.В., Коломиец Л.А., Очиров М. О., Кондакова И.В.

НИИ онкологии ТНИМЦ, Томск, Россия, 634009, пер. Кооперативный, 5
e-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru

Проведенные исследования демонстрируют возможность исследования поверхностных металлопротеиназ экзосом для целей диагностики, и в этом плане наиболее перспективно изучение MMP-9+/MMP2-/EMMPRIN+ циркулирующих экзосом. Для прогнозирования возможности выполнения оптимальной циторедукции наряду с данными УЗИ и лапароскопии целесообразно изучении субпопуляционного состава MMP-9+ как циркулирующих, так и асцитических экзосом.

Ключевые слова: металлопротеиназы, экзосомы, рак яичников, асцит, прогноз

Экзосомальные металлопротеиназы являются важными регуляторами передачи сигналов от рецепторов фактора роста и рецепторов адгезии, играют роль в регуляции подвижности клеток и метастазировании [1]. Целью исследования было оценить уровень ADAM10, ADAM17 MMP-9, MMP-2 и EMMPRIN в циркулирующих и асцитических экзосомах у больных раком яичника (РЯ) во взаимосвязи с объемом асцита, являющимся прогностическим признаком для G3 серозных аденокарцином [2]. Образцы крови и асцита у больных с пограничными опухолями яичников (ПОЯ) (n=10; 38 ± 2,5 лет) и больных с диссеминированным РЯ IIIB,C стадии (n=35, 56,5 ± 2,5 года) использовали для выделения экзосом методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Объем асцита измеряли клинически и путем ультразвукового исследования. Экзосомы были охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии [3]. Уровень перечисленных металлопротеаз оценивали с помощью проточной цитометрии.

В экзосомах плазмы крови при ПОЯ и РЯ преобладает популяция ADAM10-/ADAM17- (до 92%). В экзосомах из асцита при ПОЯ в равной степени встречаются ADAM10+/ADAM17- и ADAM10-/ADAM17+ (до 38%), дабл-негативная популяция представлена редко (21%). При РЯ доминирует дабл-негативная популяция (86%). Показано, что большинство циркулирующих и асцитических экзосом экспрессировали MMP-9 как ПОЯ, так и при РЯ, в среднем MMP-9+ популяция составляла 70-75%. По сравнению с ПОЯ при РЯ значительно чаще в экзосомах плазмы выявлялась субпопуляция MMP-9+/MMP2-/EMMPRIN+, 7,8±1,3% при ПОЯ по сравнению с 12,0±3,9% при РЯ, p<0,05, что соответствует данным литературы о возрастании количества EMMPRIN-позитивных экзосом и микровезикул при колоректальном раке и раке молочной железы по сравнению со здоровыми [4]. При изучении субпопуляционного состава MMP-9+ циркулирующих экзосом выявлено прогрессивное снижение популяции MMP-9+/MMP2+/EMMPRIN+ при увеличении объема асцита. В асцитических экзосомах выявлено увеличение популяции MMP-9+/MMP2-/EMMPRIN- и снижение популяции MMP-9+/MMP2+/EMMPRIN- при увеличении объема асцита. При G3 серозных аденокарциномах яичников объем асцита имеет прогностическое значение и ассоциирован с вероятностью выполнения оптимальной циторедукции и безрецидивной выживаемостью [2]. Таким образом, проведенные исследования демонстрируют возможность исследования поверхностных металлопротеиназ экзосом для целей диагностики, в этом плане наиболее перспективно изучение MMP-9+/MMP2-/EMMPRIN+ циркулирующих экзосом. Для прогнозирования возможности выполнения оптимальной циторедукции наряду с данными УЗИ и лапароскопии, по-видимому, целесообразно изучении субпопуляционного состава MMP-9+ как циркулирующих, так и асцитических экзосом.

Литература:

1. Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. The role of exosomal tetraspanins and proteases in tumor progression // *Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical chemistry.*- 2018.-Vol. 12, №3.- P. 191-202.

2. Feigenberg T., Clarke B., Virtanen C. Molecular profiling and clinical outcome of high-Grade serous ovarian cancer presenting with low- versus high-volume ascites // *BMR International*.-2014.-Article ID367103.
3. Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Stakheeva M.N. et al. The characterization of exosome from biological fluids of patients with different types of cancer // *AIP Conference Proceedings*.-2017.- 1882, 020080.
4. Menck K, Scharf C, Bleckmann A. et al. Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN // *J. Mol Cell Biol.*- 2015.- Apr;7(2):143-53.

UDC 618.11-006.6-037.612.015.13

EXOSOMAL METALLOPROTEINASES IN ADVANCED OVARIAN CANCER: PROSPECTS OF CLINICAL APPLICATION

Yunusova N.V., Patysheva M.R., Zambalova E.A., Molchanov S.V., Kolomiets L.A., Ochirov M.O., Kondakova I.V.

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia, 634009, Kooperativny str., 5
e-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru

The studies demonstrate the possibility of studying surface metalloproteinases of exosomes for diagnostic purposes, and in this respect, the study of MMP-9 +/ MMP2-/ EMMPRIN + circulating exosomes is most promising. To predict the possibility of performing optimal cytoreduction along with ultrasound and laparoscopy data, it is advisable to study the subpopulation composition of MMP-9 + of both circulating and ascitic exosomes.

Key words: metalloproteinases, exosomes, ovarian cancer, ascites, prognosis

Exosomal metalloproteinases are important regulators of signal transduction from growth factor receptors and adhesion receptors, play a role in regulating cell motility and metastasis [1]. The aim of the study was to assess the level of ADAM10, ADAM17 MMP-9, MMP-2 and EMMPRIN in circulating and ascites exosomes in patients with ovarian cancer (OC) in relation to the volume of ascites, which is a prognostic sign for G3 serous ovarian adenocarcinomas [2]. Blood samples and ascites in patients with borderline ovarian tumors (BOT) (n=10; 38 ± 2.5 years) and patients with advanced OC IIIB,C stage (n = 35, 56.5 ± 2.5 years) were used for exosome isolation by ultrafiltration with ultracentrifugation. The volume of ascites was measured clinically and by ultrasound. Exosomes were characterized using transmission electron microscopy [3]. The level of the listed metalloproteases was assessed using flow cytometry.

In the exosomes of the blood plasma, the ADAM10-/ADAM17- population (up to 92%) predominated in the BOT and OC. In exosomes from ascites with BOT, ADAM10 +/ ADAM17- and ADAM10-/ ADAM17+ populations (up to 38%) are equally found, the double-negative population is rarely represented (21%). In OC, the double-negative population dominates (86%). It was shown that the majority of circulating and ascitic exosomes expressed MMP-9 both in BOT and in OC, on average, MMP-9 + population was 70-75%. Compared with BOT, in OC, subpopulation MMP-9+/MMP2-/ EMMPRIN + was detected more frequently in plasma exosomes, 7.8 ± 1.3% in BOT POJ, compared with 12.0 ± 3.9% with OC, p <0.05, which corresponds to the literature data on the increase in the number of EMMPRIN-positive exosomes and microvesicles in colorectal cancer and breast cancer compared with healthy donors [4]. A study of the subpopulation composition of MMP-9+ circulating exosomes revealed a progressive decrease in the population of MMP-9+/ MMP2 +/EMMPRIN + with an increase in the volume of ascites. In ascitic exosomes, an increase in the MMP-9+/MMP2-/ EMMPRIN- population and a decrease in the MMP-9+/MMP2+/EMMPRIN- population with an increase in the volume of ascites were detected. In G3 serous ovarian adenocarcinomas, the volume of ascites has a prognostic value and is associated with the likelihood of optimal cytoreduction and disease-free survival [2]. Thus, the our studies demonstrate the possibility of studying the surface metalloproteinases of exosomes for diagnostic purposes, in this respect the study of MMP-9+/MMP2-/ EMMPRIN+ circulating exosomes is most promising. To predict the possibility of performing optimal cytoreduction, along with ultrasound and laparoscopy data, it seems reasonable to study the subpopulation composition of MMP-9+ of both circulating and ascitic exosomes.

References:

1. Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. The role of exosomal tetraspanins and proteases in tumor progression // *Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical chemistry*.- 2018.-Vol. 12, №3.- P. 191-202.
2. Feigenberg T., Clarke B., Virtanen C. Molecular profiling and clinical outcome of high-Grade serous ovarian cancer presenting with low- versus high-volume ascites // *BMR International*.-2014.-Article ID367103.
3. Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Stakheeva M.N. et al. The characterization of exosome from biological fluids of patients with different types of cancer // *AIP Conference Proceedings*.-2017.- 1882, 020080.

4. Menck K, Scharf C, Bleckmann A. et al. Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN // J. Mol Cell Biol. - 2015. - Apr;7(2):143-53.

УДК 577.11;577.29

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ: СТАРЫЕ И НОВЫЕ ПОДХОДЫ

Штам Т.А., Самсонов Р.Б., Забегина Л.М., Ковальчук А.А., Забродская Я.А., Камышинский Р.А., Малек А.В.

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

188300, Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща, 1.

ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

197758, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

e-mail: Shtam_TA@pnpi.nrcki.ru

В рамках данной работы проведен сравнительный анализ четырех описанных ранее и нового методов выделения внеклеточных микровезикул из плазмы крови человека.

Ключевые слова: внеклеточные микровезикулы, экзосомы, методы выделения

Внеклеточные микровезикулы (ВМВ) секретируются клетками многоклеточных организмов и обеспечивают «горизонтальный» межклеточный перенос веществ и информации [1]. Этот феномен имеет важное биологическое значение и привлекает внимание тысяч исследователей. В лабораторной практике существует несколько методов выделения ВМВ из биологических жидкостей, причем выбор метода влияет на получаемые результаты. Оптимальный метод обычно определяется объемом исследуемого материала и задачами исследования, но этот выбор является нетривиальным вопросом.

В рамках данной работы был проведен сравнительный анализ четырех методов выделения ВМВ из плазмы крови человека, описанных ранее в литературе: последовательного ультрацентрифугирования, ультрацентрифугирования с использованием «подушки» сахарозы [2], агглютинация ВМВ лектинами растительного происхождения и иммунопреципитация на латексных частицах [3]. Кроме того, разработан и апробирован новый способ выделения внеклеточных везикул, с использованием коммерчески доступного реагента SubX. Метод основан на создании крупных конгломератов везикул за счет электростатического взаимодействия, возникающего в присутствии SubX. Эти крупные агрегаты могут быть седиментированы центрифугированием при относительно невысоких оборотах (15000xG). Добавление к полученному осадку избытка соли (300мМ NaCl) приводит к освобождению из агрегатов индивидуальных везикул. В исследовании проведена сравнительная оценка препаратов ВМВ, выделенных разными методами, по ряду параметров: размер, концентрация, морфология ВМВ, наличие примесей невезикулярной природы, содержание в мембране ВМВ экзосомальных тетраспанинов, содержание белка и тотальной РНК. Используются методы: анализ траекторий наночастиц (НТА), лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС), атомно-силовая микроскопия (АСМ), криоэлектронная микроскопия (Крио-ЭМ), проточная цитометрия. В целом, полученные результаты демонстрируют наличие своих достоинств и недостатков у каждого способа выделения везикул. Однако, новый способ выделения экзосом в присутствии реагента SubX, разработанный в этом исследовании, вполне может быть выбран как рутинный метод выделения экзосом из плазмы крови человека.

Работа поддержана РФФИ 18-015-00289.

Литература:

1. Tkach M, Thery C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. // Cell. 2016. 164(6). P.1226-1232.
2. Thery C., Amigorena S., Raposo G., and Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids // Current protocols in cell biology. 2006. Chapter 3, P. 3.22.1-3.22.29
3. Shtam T.A., Burdakov V.S., Landa S.B., Naryzhny S.N, Bairamukov V.Yu., Malek A.V., Orlov Yu.N., Filatov M.V. Aggregation by lectins as an approach for exosome isolation from biological fluids: Validation for proteomic studies. // Cell and Tissue Biology. 2017. 11(2). P.172-179.

UDC 577.11;577.29

METHODS OF ISOLATION OF EXTRACELLULAR MICROVESICLES FROM BIOLOGICAL FLUIDS: OLD AND NEW APPROACHES

Shtam T.A., Samsonov R.B., Zabegina L.M., Kovalchuk A.A., Zabrodska Ya.A., Kamyshinsky R.A., Malek A.V.

Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia

188300, Leningrad Region, Gatchina, Orlova Grove, 1.

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, St.

Petersburg, Russia

197758, Pesochnyi, st. Leningradskaya, 68

e-mail: Shtam_TA@pnpi.nrcki.ru

In the framework of this work, a comparative analysis of four previously described and new methods for isolating extracellular microvesicles from human blood plasma was carried out.

Key words: extracellular microvesicles, exosomes, methods of isolation

Extracellular microvesicles (EMV) are secreted by cells of multicellular organisms and provide “horizontal” intercellular transfer of substances and information [1]. This phenomenon has important biological significance and attracts the attention of thousands of researchers. In laboratory practice, there are several methods for isolating EMV from biological fluids, and the choice of method influences the results obtained. The optimal method is usually determined by the volume of the material under study and the objectives of the study, but this choice is not a trivial matter.

In this work, a comparative analysis of four methods for isolating EMV from human blood plasma described earlier in the literature was carried out: sequential ultracentrifugation, ultracentrifugation using sucrose cushion [2], agglutination of EMV with lectins of plant origin and immunoprecipitation on latex particles [3]. In addition, a new method for isolating extracellular vesicles was developed and tested using commercially available SubX reagent. The method is based on the creation of large conglomerates of vesicles due to the electrostatic interaction that occurs in the presence of SubX. These large aggregates can be sedimented by centrifugation at relatively low revs (15000xG). Adding to the resulting precipitate an excess salt (300 mM NaCl) leads to the release of individual vesicles from the aggregates. In the study, a comparative assessment of EMV preparations isolated by different methods was carried out according to a number of parameters: size, concentration, morphology of EMV, the presence of non-vesicular impurities, the content of exosomal tetraspanins in the EMV membrane, protein and total RNA contents. The following methods were used: nanoparticle tracking analysis (NTA), laser correlation spectroscopy (LCS), atomic force microscopy (AFM), cryo-electron microscopy (Cryo-EM), flow cytometry. In general, the obtained results demonstrate the presence of their advantages and disadvantages in each method of isolating the vesicles. However, a new method for isolating exosomes in the presence of SubX reagent, developed in this study, may well be chosen as a routine method for isolating exosomes from human blood plasma.

This work has been supported by the RFBR 18-015-00289.

References:

1. Tkach M, Thery C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. // *Cell*. 2016. 164(6). P.1226-1232.
2. Thery C., Amigorena S., Raposo G., and Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids // *Current protocols in cell biology*. 2006. Chapter 3, P. 3.22.1-3.22.29
3. Shtam T.A., Burdakov V.S., Landa S.B., Naryzhny S.N., Bairamukov V.Yu., Malek A.V., Orlov Yu.N., Filatov M.V. Aggregation by lectins as an approach for exosome isolation from biological fluids: Validation for proteomic studies. // *Cell and Tissue Biology*. 2017. 11(2). P.172-179.

УДК 577.1.04;577.15.03.

МУЛЬТИЛАМЕЛЛЯРНЫЕ ЛИПОСОМЫ, КАК ПЕРЕНОСЧИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Алексеева О. М.¹, Кременцова А. В.¹, Кривандин А. В.¹, Голощапов А. Н.¹, Ким Ю. А.²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия, 119334 г. Москва, ул. Косыгина, д. 4,
e-mail: olgavek@yandex.ru

²Институт биофизики клетки РАН, Московская обл. Пущино, Россия
142290 Московская обл. г. Пущино, ул. Научная д. 3. Россия.

Показано методами ДСК и малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) структурное взаимодействие мембран фосфолипидных мультислойных липосом с биологически активными веществами гидрофильной и гидрофобной природы на разных уровнях организации мембран. Обсуждается использование мультислойных липосом, как переносчиков биологически активных веществ.

Ключевые слова: мультислойные липосомы, ДСК, МУРР, биологически активные вещества

Основная мишень для воздействия экзогенных факторов на клетку животного происхождения – это внешняя мембрана. В составе мембраны значительную структурную и функциональную роль играют фосфолипиды. Соответственно в качестве средства для доставки к клеткам экзогенных факторов химической природы целесообразно выбрать многослойные везикулы - фосфолипидные мультислойные липосомы (ФМЛ) [1], встраивание которых в состав биомембраны или ассоциация с мембраной могут быть облегчены в присутствии ПЭГ (полиэтиленгликоль) или двухвалентных катионов [2-4]. Формирование ФМЛ заключается в послойном гидратировании тонких высушенных под аргонем фосфолипидных пленок из индивидуального синтетического фосфолипида – димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) или из смеси природных фосфолипидов (яичный лецитин) выше температуры их фазового перехода Рис.1.

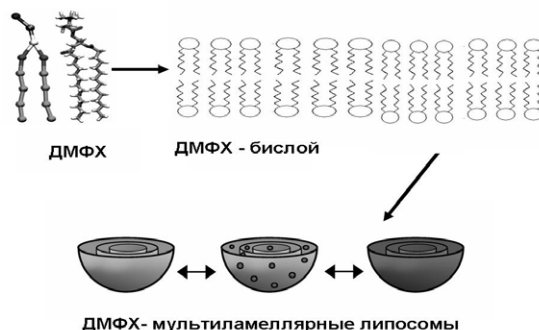


Рис.1. Схема: молекулы ДМФХ, сформированный ДМФХ - бислой, мультислойные липосомы.

При процессе формирования ФМЛ присутствие переносимого липосомами вещества не необходимо в связи с тем, что встраивание гидрофобного вещества происходит спонтанно в гидрофобные участки мембран. Встраивание гидрофильного вещества происходит при возникновении наноразмерных пор в момент риппл-фазы (фаза между эндотермическими пред - переходом и основным переходом) [5]. Методом ДСК показано, что и гидрофильные и гидрофобные вещества меняют параметры основного термодинамического фазового перехода, изменяя организацию фосфолипидных микродоменов во всех слоях ФМЛ, что указывает на присутствие веществ во всей ФМЛ. Методом МУРР показано, что гидрофильные вещества не меняют толщину бислоев и порядок их упаковки в ФМЛ, т.е. располагаются в водных прослойках между бислоями ФМЛ, не встраиваясь в бислои. Гидрофобные изменяют и толщину и порядок упаковки, что свидетельствует об их внедрении в бислои [6]. В заключении отметим, что простота формирования ФМЛ и насыщения их структуры веществами различной природы позволяет рассматривать такие фосфолипидные многослойные везикулы, сформированные как из синтетического индивидуального фосфолипида, так и из смеси природных фосфолипидов, в роли возможных переносчиков веществ к клеткам животного происхождения.

Литература:

1. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ Москва. Издательство ЛКИ. 2011. - С. 10-280.
2. Lentz B. R. Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events // *Chem. Phys. Lipids*. 1994. - V. 73. - P. 91-106.
3. Leckband D. E., Helm C. A., Israelachvili J. N. Role of calcium in the adhesion and fusion of bilayers // *Biochemistry*. - 1993. - V. 32. - P. 1127-1140.
4. Sabyrbek Zh. B., Tuleukhanov S. T., Alekseeva O. M., Kim Y. A. Study of phospholipids membranes fusion with a plasmatic membrane of cells // *Modern Problems in Biochemical Physics*. Nova Science Publishers. New York. - 2011. P. 35.
5. Антонов В. Ф., Смирнова Е. Ю., Шевченко Е. В. Липидные мембраны при фазовых переходах Москва Наука М. - 1992. - С. 125.
6. Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б., Кривандин А. В., Погорецкая И. Л. Влияние фенозана на структуру фосфолипидных мембран // *Нейрохимия*. - 1996. - Т. 13. С. 128-132.

UDC 577.1.04;577.15.03.

MULTILAMELLAR LIPOSOMES AS TRANSPORTERS OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

Alekseeva O. M.¹, Kremetsova A. V.¹, Krivandin A. V.¹, Golochshapov A. N.¹, Kim Yu. A.²

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, Russia
119334; Moscow, Kosygina Street 4,
e-mail: olgavek@yandex.ru

²Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow region. Russia.
142290 Pushchino, Moscow region. Nauchnaya Street 3.

By DSC and small-angle X-ray scattering (SAXS) methods was shown the structural relationships of multilamellar liposomes membranes with biological active hydrophilic or hydrophobic substances at the different levels of membrane's organization. The possibility of multilamellar liposomes using as transporters of biological active substances was discussed.

Key words: multilamellar liposomes, DSC, SAXS, biological active substances

The outer cellular membrane is the main target for exogenic factors actions to the cell of animal's origin. The great structural and functional roles at the membrane play the phospholipids. By this it is reasonable of using the multilayer vesicles - the phospholipid multilamellar liposomes (PML) as the transporters for delivery to cells of exogenic chemical factors [1]. PML build in the biomembranes or PML associate with membrane that processes may be facilitated in the presence of PEG (polyethylene glycol) or divalent cations [2-4]. The formation of PML provided from thin phospholipid films, which were drying under argon, by hydration of layer-by-layer above temperature their phase transition Fig 1. PML were formed from individual synthetic phospholipid - dimyristoilphosphatidylcholine (DMPC) or from mixture of nature phospholipids (egg lecithin).

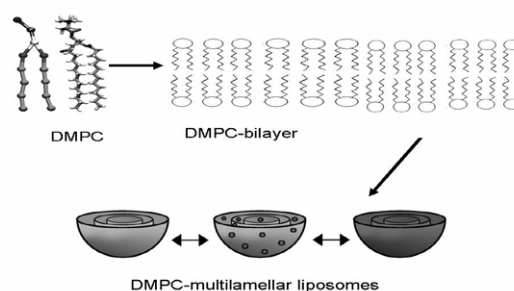


Fig. 1. Scheme: molecules DMPC, DMPC - bilayer, multilamellar liposome.

When the formation of PML occurs the presence of substances, which will be transported by the liposomes, was not necessary because the building of hydrophobic substance occurs spontaneously at the hydrophobic sites of membranes. The introducing of hydrophilic substance to the PML occurs when nano-size pores formed at ripple-

phase (the phase between endothermic phase pre-transition and main phase transition) [5]. By the DSC method was been shown that hydrophilic and hydrophobic substances change the thermodynamic parameters of the main phase transition. Respectively substances change the organization of phospholipid microdomains at all layers of PML. These facts indicate that the substances are presence at all volume of PML. By the SAXS method has been shown that the hydrophilic substances don't change of bilayers thickness and the order of their packing in PML. These facts indicate that hydrophilic substances are located in water layers between bilayers of PML and it are not build into the bilayers. Hydrophobe substances change the thickness of bilayers and the packing order of bilayers that indicates of their introduction into the bilayers of PML [6].

In conclusion we may accent that the simplicity of PML formation and of saturations of their structure by different substances permits us to consider such phospholipid multilayer vesicles, formed from synthetic individual phospholipid, and from mixture of nature phospholipids, in the role of eventual transporters of substances to the cells of animal origin.

References:

1. Tarachovsky Yu. S. *Intellectual nanocontainers at address transition of medical substances*. Moscow Print LKI. - 2011. - P.10-280
2. Lentz B. R. *Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events* // *Chem. Phys. Lipids*. 1994. - V. 73. - P. 91-106.
3. Leckband D. E., Helm C. A., Israelachvili J. N. *Role of calcium in the adhesion and fusion of bilayers* // *Biochemistry*. - 1993. - V. 32. - P. 1127-1140.
4. Antonov V. F., Smirnova E. Yu., Shevchenko E. V. *Lipid membrane in phase transformations*. M. Science. 1992. P. 125.
5. Sabyrbek Zh. B., Tuleukhanov S. T., Alekseeva O. M., Kim Y. A. *Study of phospholipids membranes fusion with a plasmatic membrane of cells* // *Modern Problems in Biochemical Physics*. Nova Science Publishers. N. Y. - 2011. - P.35.
6. Archipova G. V., Burlakova E. B., Krivandin A. V., Pogoretskaya I. L. *Phenozan influence to the structure of phospholipid membranes* // *Neurochemistry*. - 1996. - V. 13. P. 128-132.

УДК 573.6 - 022.532

РАЗРАБОТКА МАГНИТНЫХ ЛИПОСОМ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С РАЗЛИЧНОЙ АНИЗОМЕТРИЕЙ

**Ванзаракшаева С.Ч.¹, Власова К.Ю.¹, Ле-Дейген И.М.¹, Усвалиев А.Д.¹, Головин Ю. И.², Кабанов А.В.^{1,3},
Клячко Н.Л.^{1,2,3}**

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

²Тамбовский государственный университет имени Г.Р.Державина, Тамбов, Россия

³Университет Северной Каролины в Чапел Хилл, Чапел Хилл, США

119234, Москва, Ленинские горы, 1 ст.11

e-mail: saryuna.v@gmail.com

Получены липосомы с ковалентно иммобилизованными на их поверхность наночастицами оксида железа в форме «сфер» и «стержней». Изучено влияние негреющего низкочастотного переменного магнитного поля (ПМП) на проницаемость мембраны полученных липосом.

Ключевые слова: магнитные липосомы, наночастицы оксида железа

Одной из перспективных и хорошо изученных форм контейнера для доставки лекарственного препарата являются липосомы и мицеллы. Данный тип контейнеров позволяет доставлять как гидрофильные, так и гидрофобные молекулы разного размера, но при этом одним из значимых недостатков является медленное, а порой полное отсутствие высвобождения активных молекул (в особенности, высокомолекулярных соединений - ВМС). С целью повышения эффективности высвобождения применяют стимул-чувствительные липосомы, которые реагируют на изменения pH среды, температуры, воздействие света и магнитного поля. Преимуществом магнитного поля являются его высокая проникающая способность и безопасность для пациента. В качестве посредника между магнитным полем и наноконтейнером выступают магнитные наночастицы (МНЧ). В данной работе мы изучаем новый подход к упрощению и улучшению высвобождения препарата из липосомальных контейнеров, функционализированных МНЧ различной формы – «сферами» и «стержнями», под действием низкочастотного ПМП. Мы полагаем,

что при действии НЧ ПМП преобладает релаксация по Брауну, приводящая к механическому вращению наночастиц и разупорядочиванию мембраны липосом. Согласно теоретическим расчетам, процент высвобождения препарата в случае липосом с МНЧ в форме стержней будет больше за счет большего угла вращения, чем с МНЧ сферической формы. Целью данной работы является разработка магнитных липосом с иммобилизованными на их поверхности МНЧ различной анизотропии и изучение проницаемости мембраны в условиях ПМП.

Липосомы получали путем гидратации липидной пленки с последующей гомогенизацией методом экструзии. МНЧ, стабилизированные нитродопамином, ковалентно «пришивались» карбодиимидным методом к карбоксильным группам, расположенными на поверхности липосом. Образцы анализировали методом динамического светорассеяния, анализом траекторий наночастиц, просвечивающей электронной микроскопией, ИК-Фурье спектроскопией НРВ, спектрофотометрически. Получены магнитные липосомы с размером 200 ± 15 нм, с узким окном полидисперсности. Экспериментально доказано, что эффективность пришивки зависит от количества липида, отвечающего за наличие карбоксильных групп на поверхности липосом (DSPE-PEG-carboxy). Так, при содержании DSPE-PEG-carboxy 3,2 мол.% к поверхности липосом пришиваются от 1-ой до 3-х сферических МНЧ и до 5ти МНЧ в форме стержней.

Исследования высвобождения флуоресцентной метки (кальцеина) из магнитных липосом под действием низкочастотного ПМП (50 Гц, 50 мТл) показали увеличение проницаемости мембраны как для липосом со сферическими МНЧ, так и для стержней. Однако, ожидаемой разницы эффекта между двумя видами магнитных липосом, в рамках погрешности, не наблюдалось.

Исследования проводились при поддержке грантов РФФИ 17-54-33027 и 18-29-09154.

UDC 573.6 - 022.532

THE DEVELOPMENT OF MAGNETIC LIPOSOMES-BASED IRON OXIDE NANOPARTICLES WITH DIFFERENT ANISOMERIA

Vanzarakshaeva S.Ch.¹, Vlasova K.Yu.¹, Le-Deygen I.M.¹, Usvaliev A. D.¹, Golovin Y.I.², Kabanov A.V.^{1,3}, Klyachko N.L.¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

³University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, U.S.A

119234, Moscow, 1-11 Leninskiye Gory

e-mail: saryuna.v@gmail.com

We obtained liposomes with covalently immobilized iron oxide nanoparticles of various forms ("spheres" and "rods") on their surfaces. We studied the influence of a non-heating low-frequency alternating magnetic field (LF-AMF) on the membrane permeability of liposomes.

Key words: magnetic liposomes, iron oxide nanoparticles

One of the promising and well-studied type of drug delivery container is liposomes. This type of containers deliver both hydrophilic and hydrophobic molecules of various sizes, but one of the significant drawback is the slow release or complete lack of the release of active molecules (in particular, high – molecular weight compounds). To increase the membrane permeability stimulus-sensitive liposomes, which react to the changes of the pH, temperature, exposure to light and magnetic field, are used. The advantage of the magnetic field is its high entering power and safety for the patient. Magnetic nanoparticles (MNPs) act as a mediator between the magnetic field and the nanocontainers. In this work, we study a new approach to simplify and improve the release of the drug from liposomal containers, which are functionalized with MNPs of various shapes – "spheres" and "rods", under the action of LF-AMF. The behavior of MNPs in liposomes, exposed to LF-AMF, is characterized by Brown relaxation. We suppose, nanoparticles can rotate and mechanically destroy the lipid membrane. Theoretically, in the case of liposomes with "rods" the percentage of the drug release would be greater due to a greater angle of rotation than with "spherical" MNPs. The aim of this work was to develop magnetic liposomes, conjugated with spherical- and rod-shaped MNPs on their surfaces, and to study the effect of LF-AMF (30-400 Hz) on their permeability.

Liposomes were produced via thin film method. MNPs were stabilized with N-dopamine and then covalently linked then to the carboxyl group of the liposomal surface, using carbodiimide method. The samples were analyzed by dynamic light scattering, nanoparticle track analysis, transmission electron microscopy, ATR-FTIR and spectrophotometry. It is experimentally proved that the effectiveness of covalent binding of MNPs depends on the amount of lipid, responsible for the presence of carboxyl groups on the surface of liposomes (DSPE-PEG-carboxy).

So, at the content of 3,2 mol.% DSPE-PEG-carboxy from 1 to 3 “spherical” MNPs and up to 5 “rods”-like MNPs are linked to the surface of the liposomes.

The study of the release of the fluorescent label (calcein) from magnetic liposomes under exposures to LF AMF (50 Hz, 50 mT) showed an increase in membrane permeability of liposomes with both types of MNPs – “spherical” and “rods-like”. However, the significant difference in release of the both types of magnetic liposomes was not observed.

Investigation was supported by RFBR 17-54-33027 and 18-29-09154 grants.

УДК 57.085.23

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВОСПРОИЗВОДИМОГО ПОЛУЧЕНИЯ КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ ИПСК ЧЕЛОВЕКА.

Коробко Е.С.¹, Супруненко Е.А.¹, Евтушенко Е.Г.², Зубкова О.Н.¹

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет¹, химический факультет², Москва, Россия

¹ 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.12

² 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.3

e-mail: suprunenkoe@mail.ru

Предложена методика культивирования ИПСК человека, демонстрирующая стабильно высокую продукцию внеклеточных везикул в культуральную среду ($1,0\text{--}1,7 \times 10^{10}$ част./мл). При помощи модифицированного протокола дифференциального центрифугирования из таких культуральных сред получены препараты внеклеточных везикул высокой концентрации ($0,9\text{--}2,8 \times 10^{11}$ част./мл).

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека, внеклеточные везикулы (ВВ), кондиционированная среда, метод анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle tracking analysis (NTA)), дифференциальное центрифугирование

Фундаментальные основы регуляций клеточных дифференцировок являются перспективным направлением, дающим выход в практическую регенеративную медицину. Особенно привлекательны в этой области ИПСК человека, способные дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков. Инструментом, обеспечивающим межклеточные взаимодействия, в том числе и направления дифференцировок, в настоящее время рассматриваются продуцируемые клетками внеклеточные везикулы (ВВ). ВВ ИПСК особенно интересны, поскольку с одной стороны могут участвовать в поддержании плюрипотентного состояния клеток, а с другой стороны, предположительно, обеспечивать широту спектра дифференцировок.

Одной из проблем получения ВВ различных типов клеток является выбор оптимальных условий культивирования данных клеток, способный обеспечить стабильно высокую концентрацию ВВ, а также обеспечение чистоты полученных препаратов.

В работе были использованы ИПСК человека линии KYOU-DXR0109B Human Induced Pluripotent Stem (IPS) Cells[201B7] (ATCC R ACS-1023™), полученные из дермальных фибробластов, любезно предоставленные лабораторией клеточной биологии института биологии развития им. Н.К.Кольцова. Клетки культивировали по стандартной методике, используя в качестве подложки матригель.

Для культивирования ИПСК наиболее популярными являются такие коммерческие среды, как Essential 8™ Medium (E8M) и mTeSR™1. Культуры ИПСК человека на белковых матриксах потенциально могут быть адаптированы для культивирования на обеих средах. На основании сравнительной оценки количества примесных частиц в обеих средах методом анализа траекторий наночастиц (ATH) для культивирования была выбрана среда E8M (концентрация частиц в диапазоне от 20 до 250 нм $Cl_{95} = 0,4 \pm 0,2 \times 10^8$ част./мл против $Cl_{95} = 10,6 \pm 2,7 \times 10^8$ част./мл в чистой mTeSR™1). В качестве оптимального для получения стабильно высокой концентрации ВВ ИПСК мы выбрали следующий режим: культивирование клеток до достижения ими 30-40% конфлюэнтного монослоя (до смыкания краев колоний) при ежедневной смене ростовой среды, согласно стандартной методике культивирования, далее культивирование в течение 2 суток без смены ростовой среды. Иммуноцитохимический и молекулярно-генетический анализ ИПСК при таком ре-

жиге культивирования показал сохранение основных маркеров плюрипотентности (Oct-4, Sox-2, Nanog, LIN28A, Tra-1-60). Полученная кондиционированная среда была использована для выделения ВВ методом дифференциального центрифугирования (высокоскоростная стадия 60 мин. при 102 198 g, OPTIMA™ L-90K (Beckman Coulter, США) с ротором SW55Ti.). Получаемые препараты ВВ ИПСК человека по данным АТН демонстрируют стабильно высокие концентрации частиц размерного диапазона 40-120 нм ($0,9 - 2,8 \times 10^{11}$ част./мл), по данным просвечивающей электронной микроскопии содержат преимущественно частицы везикулярной морфологии и могут быть использованы для изучения их молекулярно-биологических и функциональных характеристик.

UDC 57.085.23

DEVELOPING THE PROTOCOL FOR REPRODUCIBLE PREPARATION OF THE CONCENTRATED EXTRACELLULAR VESICLE SAMPLES FROM HIPSC

Korobko E.S.¹, Suprunenko E.A.¹, Evtushenko E.G.², Zubkova O.N.¹

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology¹, Faculty of Chemistry², Moscow, Russia

¹ 119991, Russian Federation, Moscow, Leninskie gory, 1-12

² 119991, Russian Federation, Moscow, Leninskie gory, 1-3

e-mail: suprunenkoe@mail.ru

The protocol of hiPSC cultivation, demonstrating consistently high production of extracellular vesicles into the culture medium ($1.0-1.7 \times 10^{10}$ particles/ml) was proposed. With a modified differential centrifugation procedure a concentrated extracellular vesicle samples ($0.9-2.8 \times 10^{11}$ particles/ml) could be isolated from such culture media.

Key words: human induced pluripotent stem cells (hiPSC), extracellular vesicles (EV), conditioned media, Nanoparticle tracking analysis (NTA), differential centrifugation

The research on fundamentals of the cellular differentiations regulation is a promising scientific area, providing the access to the practical regenerative medicine. hiPSCs that are able to differentiate into tissues of all three germ layers are especially attractive for these purposes. Extracellular vesicles (EVs) produced by eukaryotic cells nowadays are considered as a tool that provides cell-to-cell interactions, including the way of differentiation. EVs from human induced pluripotent stem cells (hiPSC) are especially interesting, because they can support the pluripotent state of cells, and, presumably, provide the diversity of the differentiation spectrum.

One of the problems with isolation the EV from various types of cells is the choice of the optimal conditions for the cultivation of these cells. The proper protocol has to provide a consistently high concentration of EVs in conditioned medium, as well as to ensure the purity of the isolated EV preparations.

In current work hiPSC (KYOU-DXR0109B Human Induced Pluripotent Stem (IPS) Cells[201B7] (ATCC®ACS-1023™)) derived from dermal fibroblasts, kindly provided by the Laboratory of Cell Biology in the Institute of Development Biology. N.K. Koltsova were used. The cells were cultured using a standard methodology on a Matrigel™ Matrix-coated surface.

Two most popular commercial culture media for hiPSC cultivation are Essential 8™ Medium (E8M) and mTeSR™1. hiPSC culture on protein matrix can potentially be adapted for cultivation on both media. Based on comparison of the amount of impurity particles in both pure media by Nanoparticle tracking analysis (NTA), we chose E8M, which demonstrated the particle concentration in a range of 20-250 nm $Cl_{95} = 0.4 \pm 0.2 \times 10^8$ particles/ml versus $Cl_{95} = 10.6 \pm 2.7 \times 10^8$ particles/ml in pure mTeSR™1). As an optimum for obtaining a consistently high concentration of hiPSC EVs, we selected the following procedure. First we cultivated the cells until they reach a 30-40% confluent monolayer (until the edges of the colonies touched on each other) with daily change of the growth media, according to the standard cultivation protocol. Further we cultured cells for 2 days without changing growth media. Immunocytochemical and molecular genetic analysis of hiPSC showed that the key markers of pluripotency (Oct-4, Sox-2, Nanog, LIN28A, Tra-1-60) are preserved in such cultivation regime. The collected conditioned media was used for isolation of EVs by differential centrifugation (high-speed step 60 min at 102 198 g, OPTIMA™ L-90K with c rotor SW55Ti). NTA analysis of purified hiPSC EVs demonstrated consistently high concentrations of particles in the size range of 40-120 nm ($0.9 - 2.8 \times 10^{11}$ particles/ml). Transmission electron microscopy confirmed predominantly vesicular morphology of observed particles. Thus, the developed protocol could be used for preparation of concentrated samples of EVs from hiPSC suitable for studies of their molecular biological and functional characteristics.

УДК 57.087

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСОСОМ КОНДИЦИОННЫХ СРЕД И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Сомов А.К., Тутанов О.С., Проскура К.В., Штам Т.А., Григорьева А.Е., Юнусова Н.В., Рябчикова Е.И., Лактионов П.П., Тамкович С.Н.

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8
e-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru

Для нормировки препаратов экзосом из кондиционных сред первичных и трансформированных клеток и биологических жидкостей человека (плазма крови, моча, слеза, асцит) экзосомы выделены и охарактеризованы по морфологии, размеру и концентрации везикул, по содержанию белка и основных маркеров (CD9, CD24, CD63, CD81).

Ключевые слова: экзосомы, выделение, трековый анализ, проточная цитофлуорометрия, тетраспанины

Экзосомы присутствуют во многих биологических жидкостях и, передавая сигналы между клетками, участвуют в развитии патологических процессов. На сегодняшний день используют различные методы их выделения, ведутся работы по разработке методов диагностики и лечения заболеваний на основе экзосом [1]. При этом на начальном этапе возникает серьезная проблема выделения и нормирования чистых, охарактеризованных препаратов экзосом.

В представленной работе проведено сравнительное исследование применимости различных методов выделения экзосом (при помощи ультрафильтрации и дифференциального ультрацентрифугирования, ультрацентрифугирования через 30% подушку сахарозы, а также осаждения экзосом с использованием коммерческого набора Exosome Isolation Kit ("Invitrogen from ThermoFisher Scientific Baltics", UAB, Литва)) из кондиционных сред первичных и трансформированных клеток и биологических жидкостей человека (плазма крови, моча, слеза, асцит). Препараты экзосом охарактеризованы по морфологии, размеру и концентрации везикул, по содержанию белка и основных маркеров (CD9, CD24, CD63, CD81) с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), трекового анализа, проточной цитофлуорометрии, а также с использованием коммерческого набора NanoOrange Protein Quantitation kit (Invitrogen).

При помощи ТЭМ было показано, что помимо экзосом во всех исследованных препаратах обнаружены четко структурированные частицы низкой электронной плотности, не имеющие ограничивающей мембраны и, соответственно, не являющиеся экзосомами (везикулами). В препаратах присутствуют два основных класса «не-везикул»: размером 20-40 нм, содержание которых составляло 10-40 % всех структур препаратов экзосом, и размером 40-100 нм. Наибольший уровень контаминации отмечен в препаратах экзосом плазмы крови. Выделение экзосом путем центрифугирования через 30% подушку сахарозы повышает селективность выделения всего на 10%. Экзосомы, выделенные с помощью коммерческого набора Exosome Isolation Kit, были не пригодны для анализа ТЭМ в связи с завышенным содержанием примесей.

Для характеристики различных субпопуляций экзосом методом проточной цитометрии, везикулы, сорбированные на покрытых антителами к тетраспанинам CD9 или CD24 латексных гранулах, были окрашены антителами к CD9, CD63 или CD81, конъюгированными с флуорофором FITC. Было показано, что микровезикулы, выделенные из культуральных сред и биологических жидкостей путем ультрафильтрации и ультрацентрифугирования, а также ультрацентрифугирования через 30% подушку сахарозы по общепринятым критериям можно отнести к классу экзосом [2].

Размер везикул, оцененный с помощью анализа их траекторий (Nanoparticle Tracking Analysis) на приборе Nanosight NS300 (Malvern, Великобритания), был на ~40% выше, чем при оценке с помощью ТЭМ (Табл. 1). Поскольку прибор фиксирует все частицы и их агрегаты, присутствующие в суспензии, с помощью трекового анализа можно сравнивать концентрацию экзосом только в препаратах, выделенных одним методом. Для оценки размера и концентрации экзосом, везикулы были выделены методом ультрафильтрации и ультрацентрифугирования. Полученные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1. Размер и концентрация везикул, выделенных из кондиционных сред и биологических жидкостей*.

Источник экзосом		Средняя концентрация экзосом $\times 10^7$ везикул/мл или 10^6	Размеры экзосом, нм
Плазма крови	Здоровые доноры	8	96 $\pm$ 16
	Больные раком молочной железы	23	127 $\pm$ 7
Слеза	Здоровые доноры	21	290 $\pm$ 58
Моча	Здоровые доноры	338	159 $\pm$ 92
Среда	GF	5	95 $\pm$ 59
	HUVEC	76	127 $\pm$ 68
	SV0-3	10	127 $\pm$ 67
	MCF-7	2	88 $\pm$ 45

*Данные везикул, выделенных из кондиционных сред, нормированы на миллион клеток, из биологических жидкостей - на 1 мл исходной биологической жидкости.

Для оценки концентрации экзосомального белка использовали коммерческий набор NanoOrange Protein Quantitation kit (Invitrogen). Полученные данные будут представлены в устном докладе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-415-540012. Авторы признательны С.Л. Васину (КД-системы и оборудование, г. Санкт-Петербург) за содействие в исследованиях.

Литература:

1. Тамкович С.Н., Тутанов О.С., Лактионов П.П. Экзосомы: механизмы возникновения, состав, транспорт, биологическая активность, использование в диагностике // Биологические мембраны 2016. Т. 33. № 3. С. 163-175.
2. Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles // J. Extracell. Vesicles. 2014. Vol. 3. P. 26913.

UDC 57.087

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXOSOMES OF CONDITIONAL MEDIA AND BIOLOGICAL FLUIDS

Somov A. K., Tutanov O. S., Proskura K. V., Stam T. A., Grigor'eva A. E., Yunusova N. V., Ryabchikova E. I., Laktionov P. P., Tamkovich S. N.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, pr. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia
e-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru

For normalization of exosome preparations from conditioned media of primary and transformed cells and human biological fluids (blood plasma, urine, tears, ascites), exosomes were isolated and characterized by morphology, size and concentration of vesicles, protein content and main markers (CD9, CD24, CD63, CD81).

Key words: exosomes, isolation, nanoparticle tracking analysis, flow cytometry, tetraspanines

Exosomes are present in many biological fluids and, transmitting signals between cells, participate in the development of pathological processes. Today various methods of their isolation are used, work is underway to develop methods for diagnosing and treating diseases based on exosomes [1]. At the initial stage, there is a serious problem of isolating and rationing pure, characterized preparations of exosomes.

This paper presents a comparative study of the applicability of various methods for isolating exosomes (using ultrafiltration and differential ultracentrifugation, ultracentrifugation through a 30% sucrose cushion, and

sedimentation of exosomes using the commercial Exosome Isolation Kit ("Invitrogen from ThermoFisher Scientific Baltics", UAB, Lithuania)) from conditioned media of primary and transformed cells and human biological fluids (blood plasma, urine, tear, ascites). Exosome preparations were characterized by morphology, size and concentration of vesicles, protein content and main markers (CD9, CD24, CD63, CD81) using transmission electron microscopy (TEM), tracking analysis, flow cytometry, and also using the commercial NanoOrange Protein Quantitation kit (Invitrogen).

By TEM was shown that in addition to the exosomes, in all the studied preparations, clearly structured particles of low electron density were found, which have no limiting membrane and, accordingly, are not exosomes (vesicles). In the preparations there are two main classes of "non-vesicle": 20-40 nm in size, the content of which was 10-40% of all the structures of the preparations of exosomes, and 40-100 nm in size. The highest level of contamination is noted in the preparations of exosomes of blood plasma. Isolation of exosomes by centrifuging through a 30% sucrose cushion increases the selectivity of excretion by as little as 10%. The exosomes isolated using the Exosome Isolation Kit commercial kit was not suitable for TEM analysis due to the exorbitant impurity content.

To characterize different subpopulations of exosomes by flow cytometry, the vesicles adsorbed onto CD9 or CD24 latex beads coated with antibodies to tetraspanins were stained with antibodies to CD9, CD63, or CD81 conjugated to FITC fluorophore. It was shown that microvesicles isolated from culture media and biological fluids by ultrafiltration and ultracentrifugation, as well as ultracentrifugation through a 30% sucrose cushion, according to generally accepted criteria, can be classified as exosomes [2].

The size of the vesicles, estimated by analyzing their trajectories (Nanoparticle Tracking Analysis) on a Nanosight NS300 (Malvern, UK), was ~ 40% higher than when estimated using TEM (Table 1). Since the device captures all the particles and their aggregates present in the suspension, using the track analysis, it is possible to compare the concentration of exosomes only to preparations isolated by one method. To assess the size and concentration of exosomes, the vesicles were isolated by ultrafiltration and ultracentrifugation. The data obtained are given in table 1.

Table 1. Size and concentration of vesicles isolated from conditioned media and biological fluids*.

Source of exosomes		Medium concentration of exosomes $\times 10^7$ vesicles/ml or 10^6	Size of exosomes, nm
Blood plasma	Healthy donors	8	96 $\pm$ 16
	Breast cancer patients	23	127 $\pm$ 7
Tear	Healthy donors	21	290 $\pm$ 58
Urine	Healthy donors	338	159 $\pm$ 92
Medium	GF	5	95 $\pm$ 59
	HUVEC	76	127 $\pm$ 68
	SVO-3	10	127 $\pm$ 67
	MCF-7	2	88 $\pm$ 45

* These vesicles isolated from conditioned media are normalized to a million cells, from biological fluids to 1 ml of the original biological fluid.

To assess the concentration of the exosomal protein, the commercial NanoOrange Protein Quantitation kit (Invitrogen) was used. The data will be presented in an oral report.

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Novosibirsk Region in the framework of the research project No. 18-415-540012. The authors are grateful to S.L. Vasin (CD systems and equipment, St. Petersburg) for his assistance in research.

References:

1. Tamkovich S. N., Tutanov O. S., Laktionov P. P. Exosomes: Generation, Structure, Transport, Biological Activity, and Diagnostic Application // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 2016. V. 10. No. 3. P. 163–173.
2. Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles // *J. Extracell. Vesicles*. 2014. Vol. 3. P. 26913.

ИММУННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

IMMUNE BIOTECHNOLOGY

1. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ СИСТЕМЫ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА И МАТРИЦА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, Овчинникова Т.В.	164
ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS MOLECULAR FACTORS OF THE INNATE IMMUNITY SYSTEM AND A SCAFFOLD FOR THE DESIGN OF NEW DRUGS, Ovchinnikova T.V.	165
2. ВЫЯВЛЕНИЕ IGG АНТИТЕЛ К ЭПО У ПАЦИЕНТОВ, ПРОХОДЯЩИХ ТЕРАПИЮ ПРЕПАРАТАМИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭТИНА, Кудряшова А.М., Михайлова Н.А., Генералова Г.А., Абасеева Т.Ю., Борисова О.В.	166
DETECTION OF IGG ANTIBODIES TO EPO IN SERA PATIENTS TREATMENT WITH RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN, Kudryashova A.M., Mikhailova N.A., Generalova G. A., Abasheeva T. Y., Borisova O.V.	166
3. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ (РВС), Михайлова Н.А., Калошин А.А., Зимина Е.М., Солдатенкова А.В., Калинин Е.М., Поддубиков А.В., Плеханова Н.Г., Викторов Д.В.	167
PRECLINICAL RESEARCH OF PSEUDOMONAS RECOMBINANT VACCINE (PRV), Mihailova N.A., Kaloshin A.A., Zimina E.M., Soldatenkova A.V., Kalinichenko E.O., Poddubikov A.V., Plekhanova N.G., Victorov L.V.	168
4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ GAPR-1 И KPNA-4 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ HTLV-1 ПУТЕМ СКРИНИНГА БИБЛИОТЕКИ НОКАУТОВ GeCKO, Комков Д.С., Грибалева Е.О., Атемасова А.А., Зотова А.А., Мазуров Д.В.	169
IDENTIFICATION OF GAPR-1 AND KPNA-4 AS POTENTIAL HTLV-1 REPLICATION FACTORS BY GeCKO KNOCKOUT LIBRARY SCREENING, Komkov D.S., Gribaleva E.O., Atemasova A.A., Zotova A.A., Mazurov D.V.	170
5. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА КАТИОННОГО ПЕПТИДА И МОЛЕКУЛ МИРНК, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ IL-4 И IL-13, НА МОДЕЛИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА У МЫШЕЙ, Е.Д.Барвинская 171	171
THE STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF THE COMPLEX OF CATIONIC PEPTIDE AND SIRNA MOLECULES TARGETED TO IL-4 AND IL-13 IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC RHINITIS, E.Barvinskaya 172	172
6. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЦЕНТРА СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ В МОЛЕКУЛЕ АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ LENS CULINARIS, Романова Т.В., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. 173	173
STUDY OF THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF LIGAND-BINDING SITE OF THE ALLERGEN FROM THE LENTIL LENS CULINARIS, Romanova T.V., Melnikova D.N., Ovchinnikova T.V. 174	174
7. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ПОЛИФЕМУЗИНА III, Маргграф М.Б., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В. 174	174
STUDY ON CYTOTOXIC EFFECTS OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE POLYPHEMUSIN III, Marggraf M.B., Kuzmin D.V., Panteleev P.V., Ovchinnikova T.V. 175	175
8. ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, Берлина А.Н., Бартош А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. 176	176
IMMUNOCHEMICAL DETERMINATION OF ANTIBIOTICS IN HUMAN BLOOD SERUM, Berlina A.N., Bartosh A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. 176	176
9. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА ДРОЖЖЕЙ PICHIA PASTORIS – ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ГМ-КСФ ЧЕЛОВЕКА, Пыхтина М.Б., Романов В.П., Беклемишев А.Б. 177	177
CONSTRUCTION OF THE YEAST PICHIA PASTORIS STRAIN - PRODUCER OF THE RECOMBINANT HUMAN GM-CSF, Pykhtina M.B., Romanov V.P., Beklemishev A.B. 178	178
10. ЛИНЕЙНЫЕ И ДЕНДРИМЕРНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИВИРУСНЫЕ СРЕДСТВА, Шиловский И.П., Андреев С.М., Кожихова К.В., Барвинская Е.Д., Хаитов М.Р. 179	179
LINEAR AND DENDRIMERIC PEPTIDES AS PERSPECTIVE ANTI-VIRUS AGENTS, Shilovskiy I.P., Andreev S.M., Kozhikhova K.V., Barvinskaya E.D., Khaitov M.R. 180	180
11. НОВЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ДЕФЕНСИНА ЧЕЧЕВИЦЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ, Финкина Е.И., Канушкина М.Д., Богданов И.В., Егорова Е.А., Матвеевская Н.С., Овчинникова Т.В. 181	181
NEW PROPERTIES OF RECOMBINANT DEFENSIN FROM LENTIL AND PROSPECTS FOR ITS APPLICATION, Finkina E.I., Kanushkina M.D., Bogdanov I.V., Egorova E.A., Matveevskaya N.S., Ovchinnikova T.V. 182	182

12. ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВАГИНИТОВ СМЕШАННОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ПЕНТАДЕФЕНИНА И ПРОТИВОВИРУСНОГО ПЕПТИДА АЛЛОФЕРОНА, Колобов А.А., Колодкин Н.И., Стефаненко Л.И., Афонина И.В., Смирнова М.П., Колобов А.А.....	182
MEDICATION FOR MIXED ETIOLOGY VAGINITIS TREATMENT BASED ON ANTIMICROBIAL PEPTIDE PENTADEFENINE AND ANTIVIRAL PEPTIDE ALLOFERON, Kolobov A.A., Kolodkin N.I., Stefanenko L.I., Afonina I.V., Smirnova M.P., Kolobov A.A.....	183
13. РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МАРКЕРА С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В КАЧЕСТВЕ МЕТКИ, Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.....	184
DEVELOPMENT OF A HIGH-SENSITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM FOR DETERMINATION OF THE INFLAMMATORY MARKER C-REACTIVE PROTEIN USING QUANTUM DOTS AS A LABEL, Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.	185
14. СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ, Михайлова Н.А., Зимина Е.М., Лазарев С.А.	185
MODERN DIRECTIONS OF IMMUNOPROPHYLACTIC SYNEGIC INFECTION, Michailova N.A., Zimina E.M., Lazarev S.A. ..	186
15. СОВРЕМЕННЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА МЕТОДОМ CRISPR-CAS9, Новожилова Н.М. ..	187
NEW WORKFLOW TOOLS FOR CRISPR-CAS9 GENOME EDITING, Novozhilova N.M.	188
16. СОЗДАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ АНТИГЕННОЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ ДЛЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ, Т.И.Манухова, Е.А.Евтушенко, Н.А.Никитин, О.В.Карпова.....	188
THE DEVELOPMENT OF VERSATILE ANTIGENIC DETERMINANT FOR THE AVIAN INFLUENZA VIRUS VACCINE, T. Manukhova, E. Evtushenko, N. Nikitin, O. Karpova	189
17. СТИМУЛЯЦИЯ ОБЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА КОМПЛЕКСНЫМ РАСТИТЕЛЬНОМ ПРЕПАРАТОМ, Турмагамбетова А.С., Алексюк М.С., Богоявленский А.П., Алексюк П.Г., Омиртаева Э.С., Березин В.Э.	190
STIMULATION OF GENERAL ANTI-VIRAL IMMUNITY OF COMPLEX PLANT PREPARATION, Turmagambetova A.S., Alexyuk M.S., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk P.G., Omirtaeva E.S., Berezin V.E.....	191
18. УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПУТЕМ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНИ ТИМУСА В ПЕРЕДНЮЮ КАМЕРУ ГЛАЗА, П.А. Глазкова.....	192
INCREASED LONGEVITY OF EXPERIMENTAL ANIMALS BY TRANSPLANTING THYMUS TISSUE INTO THE ANTERIOR CHAMBER OF THE EYE, P.A. Glazkova	193

УДК 592.114:577.112.017

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ СИСТЕМЫ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА И МАТРИЦА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: ovch@ibch.ru

Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) – эволюционно древние факторы системы врождённого иммунитета многоклеточных организмов, играющие ключевую роль в их защите от инфекции. Поиск и исследование АМП, выполняющих функции защитных факторов животных и растений, позволяет лучше понять закономерности функционирования системы врождённого иммунитета и открывает путь к разработке новых лекарственных средств.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, врожденный иммунитет, пептидные антибиотики

Каждый биологический вид вырабатывает свой уникальный набор АМП, позволяющий ему успешно бороться с патогенной микрофлорой. Сходные по защитным функциям и разнообразные по структуре

пептиды были выделены из тканей беспозвоночных и позвоночных животных, а также из растений. АМП проявляют активность в отношении бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов, простейших, оболочечных вирусов, а также могут играть роль медиаторов иммунной системы. АМП отличаются спектрами антимикробной активности и способны взаимно дополнять и усиливать друг друга. АМП также характеризуются широкой вариативностью механизмов действия, включающих не только нарушение барьерной функции мембраны клетки-мишени, но и специфическое ингибирование процессов метаболизма за счет взаимодействий с молекулами на поверхности или внутри клетки. Эндогенные АМП могут также играть роль медиаторов иммунной системы (иммуномодуляторов), активируя фагоцитоз и хемотаксис, стимулируя выработку цитокинов. Изучены структуры, биологические функции и механизмы действия ряда АМП растительного и животного происхождения. Рассмотрен вопрос о биологической значимости антимикробных свойств, наблюдаемых в условиях *in vitro* и *in vivo*. Исследованы основные механизмы мембранотропного действия АМП и проанализированы причины селективности взаимодействия с микробной мембраной. Поиск и исследование АМП, выполняющих функции защитных факторов животных и растений, позволяет лучше понять закономерности функционирования системы врожденного иммунитета и открывает путь к разработке новых лекарственных средств.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00326).

UDK 592_114:577.112.017

ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS MOLECULAR FACTORS OF THE INNATE IMMUNITY SYSTEM AND A SCAFFOLD FOR THE DESIGN OF NEW DRUGS

Ovchinnikova T.V.

M.M.Shemyakin & Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10

e-mail: ovch@ibch.ru

Endogenous antimicrobial peptides (AMPs) are evolutionally ancient factors of the innate immunity of multicellular organisms. AMPs play a key role in the defense against infections. Search and investigation of animal and plant AMPs as host defense factors provide a better understanding of general mechanisms of innate immunity and open the way to development of new drugs.

Key words: antimicrobial peptides, the innate immunity, peptide antibiotics

Every biological species develops its own set of AMPs that provide an effective protection against pathogenic microflora. Peptides of various structures and similar protective functions were isolated from tissues of invertebrates, vertebrates, and plants. AMPs are active against bacteria, yeast and filamentous fungi, protozoa, and enveloped viruses. AMPs differ in their spectra of antimicrobial activities and are able to complement and reinforce each other. AMPs are also characterized by a wide variety of mechanisms of their action that involve not only disruption of target cell membranes, but effect specific inhibition of metabolism processes via interactions with specific molecules on the surface or within the cell. Endogenous AMPs can also play a role of mediators of the immune system (immunomodulators) by activation of phagocytosis and chemotaxis, and by stimulation of production of cytokines. Studies of structures, biological functions and mechanisms of action of various animal and plant AMPs were fulfilled. Biological significance of AMPs antimicrobial properties *in vitro* and *in vivo* was examined. Main mechanisms of AMPs action toward microbial membranes were investigated, and principles of selectivity of interactions were analyzed. Search and investigation of animal and plant AMPs as host defense factors provide a better understanding of general mechanisms of innate immunity and open the way to development of novel medicines.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 19-14-00326).

ВЫЯВЛЕНИЕ IGG АНТИТЕЛ К ЭПО У ПАЦИЕНТОВ, ПРОХОДЯЩИХ ТЕРАПИЮ ПРЕПАРАТАМИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭТИНА

Кудряшова А.М.¹, Михайлова Н.А.¹, Генералова Г.А.², Абасеева Т.Ю.², Борисова О.В.¹,

¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

115088, Москва, 1-я Дубровская улица, д. 15.

e-mail: 2238250@rambler.ru;

²Центр гравитационной хирургии крови и гемодиализа «ГБУЗ ДГКБ святого Владимира ДЗМ», Москва, Россия
107014 Москва, Рубцовско-Дворцовая, 1/3

Разработан метод твердофазного ИФА, позволяющий с высокой чувствительностью выявлять IgG антитела к ЭПО методом в сыворотках пациентов, проходящих терапию препаратами эритропоэтина.

Ключевые слова: рекомбинантный эритропоэтин, твердофазный ИФА, антитела к эритропоэтину, иммуногенность.

Препараты рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭПО) используемые для лечения пациентов с эритропоэтиндефицитными анемиями обладают иммуногенностью, приводящей к выработке антител и, как следствие, к изменению фармакокинетического профиля и снижению эффективности терапии.

Материалы и методы. В работе были исследованы 95 сывороток пациентов на диализе, проходивших терапию препаратами эритропоэтина. Для сравнительного анализа в качестве отрицательных образцов были исследованы 134 сыворотки здоровых доноров, никогда не получавших препараты ЭПО.

Выявление антител к эритропоэтину в сыворотках проводили в формате твердофазного ИФА при иммунохимической иммобилизации биотинилированного рчЭПО через предварительно иммобилизованный стрептавидин. Далее вносили исследуемые образцы в разведении 1:50, затем антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена и добавляли субстратную буферную систему 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидина. ОП измеряли при длине волны 450нм/680нм на фотометре.

Чувствительность и специфичность оценивалась двумя способами: 1) путём сравнения значений индексов позитивности анализируемых сывороток, определяемого как отношение ОПобразца/ОПпорог., где ОПпорог. = ОПср.К + 3σ, где ОПср.К - среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки отрицательных образцов; полученный результат ≥ 1 оценивался как свидетельство наличия специфических антител; 2) методом ROC-анализа.

Результаты. На основании исследования отрицательных образцов и ROC-анализа полученных данных было установлено пороговое значение ОП для определения чувствительности и специфичности ИФА. Чувствительность и специфичность для исследованной выборки составили 100% и 98,8% соответственно. Коэффициент вариации не превышал 8%. Подтверждение специфичности выявления суммарных IgG антител проводили путем выявления антител IgG1 и IgG4 изотипов. Из 95 проанализированных сывороток крови пациентов, проходивших терапию препаратами эритропоэтина у 38 (40%) были детектированы IgG антитела к ЭПО с индексом позитивности 11.8-1,2.

DETECTION OF IGG ANTIBODIES TO EPO IN SERA PATIENTS TREATMENT WITH RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Kudryashova A.M.¹, Mikhailova N.A.¹, Generalova G.A.², Abasheeva T.Y.², Borisova O.V.¹

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

115088, Moscow, 1-ya Dubrovskaya street, 15

²St. Vladimir Center of gravitational surgery of blood and hemodialysis, Moscow, Russia

107014 Moscow, Rubtsovo-Dvortsovaya, 1/3

e-mail: 2238250@rambler.ru

The developed ELISA, allowing with high sensitivity to detect IgG antibodies to EPO in serum of patients treated with erythropoietin.

Key words: recombinant erythropoietin, ELISA, antibodies to erythropoietin, immunogenicity.

Recombinant human erythropoietin (rhEPO) used for the treatment of patients with erythropoietin deficiency anemia have immunogenicity. This leads to the appearance of specific antibodies and to changes in the pharmacokinetics and reduce the effectiveness of therapy.

Materials and methods. Clinical sera samples of 95 patients erythropoietin treatment on dialysis and 134 sera samples from healthy donors as negative control were used. Detection of antibodies to EPO in the sera samples was carried out in indirect ELISA. Biotin was linked to rhEPO and captured with streptavidin on a solid substrate. The studied samples were added in a dilution of 1:50 and subsequently were added HRP-labeled antibody. The results of the enzymatic reaction of peroxidase with hydrogen peroxide in the presence of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine were measured photometrically at a wavelength of 450nm / 680nm.

Sensitivity and specificity were evaluated in two ways: 1) by comparing the values of the sera positivity index, calculated as $OD_{\text{sample}}/OD_{\text{cut-off}}$, where $OD_{\text{cut-off}}$ the mean signal of the of negative samples + 3σ . The result ≥ 1 was evaluated as containing of specific antibodies; 2) by ROC-analysis.

Results. The cut off value using a collection of 134 negative sera samples and ROC-analysis was calculated. Sensitivity and specificity for the studied sera sample were 100% and 98.8%, respectively. The coefficient of variation did not exceed 8%. Confirmation of total IgG antibodies detection specificity was carried out by detection of antibodies IgG1 and IgG4 isotypes. Among of 95 analyzed sera samples from dialysis patients 38 (40%) had IgG antibodies to EPO with a positivity index of 11.8-1.2. Antibodies to EPO with a positivity index of 11.8-1.2 were detected in 38 (40%) among of 95 analyzed sera samples from dialysis patients.

УДК 615.371:616-022.7

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ (РВС)

Михайлова Н.А.¹, Калошин А.А.¹, Зими́на Е.М.¹, Солдатенкова А.В.¹, Калиниченко Е.М.¹, Поддубиков А.В.¹, Плеханова Н.Г.², Викторов Д.В.²

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

105064, г. Москва, М. Казенный пер., 5а

e-mail: alex-k-1973@yandex.ru

²Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Волгоград, Россия

400131, г. Волгоград, Голубинская ул., 7

Проведены доклинические исследования рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС). Подтверждены стерильность, апиrogenность и иммуногенные свойства. При изучении *аллергенных свойств*, аномальной острой и хронической токсичности в экспериментах доказана хорошая переносимость, безвредность и безопасность вакцины.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, рекомбинантная синегнойная вакцина (РВС).

Проведены доклинические исследования рекомбинантной синегнойной вакцины (РВС), предназначенной для профилактики гнойно-воспалительных заболеваний, вызываемых синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*). Основой вакцины явились рекомбинантная форма белка F наружной мембраны (OprF) и рекомбинантный делеционный вариант экзотоксина А (анатоксин), сорбированные на геле гидроокиси алюминия. Такая композиция позволила получить препарат, обладающий более выраженными защитными свойствами, в сравнении с ведением отдельных рекомбинантных белков. Индекс эффективности защитных свойств от живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* штамма PA103 для отдельных белков (OprF и анатоксина) соответствовал 2,0 – 2,3. В то же время, индекс защитных свойств трех экспериментальных серий РВС, полученных с целью доклинических исследований, составил 3,0 – 3,3.

В рамках проведения доклинических исследований оценены стерильность, подлинность, а также показано отсутствие примесей ДНК штаммов-продуцентов. Для определения количества эндотоксина препараты исследовали в хромогенном ЛАЛ-тесте. Количество эндотоксина в опытных сериях вакцины

не превышало порогового значения. Апирогенность РВС подтверждена в экспериментах на животных. Вакцина не вызывала температурных реакций при введении кроликам. В опытах на мышах и морских свинках показано отсутствие аномальной токсичности препаратов. Исследование аллергенных свойств осуществляли методом подкожного введения вакцины морским свинкам. Выявлены незначительные аллергические реакции при введении животным препаратов, в дозе, десятикратно превышающей предполагаемую дозу для человека. В ответ на введение мышам рекомбинантной вакцины отсутствовали реакции гиперчувствительности замедленного типа.

При исследовании острой и хронической токсичности вакцины животным двух видов вводили одну и десять человеческих доз. При изучении острой токсичности препарат вводили мышам и морским свинкам, а при оценке хронической токсичности вакцину вводили ежедневно в течение 10 суток крысам и морским свинкам. В первом случае исследование животных проводили на 7-е и 15-е сутки, а во втором – на 11-е сутки. Производили контроль веса животных, оценку гематологических показателей (общий и биохимический анализы крови), патоморфологические и гистологические исследования. Анализ полученных результатов не выявил достоверно значимых патологических изменений у подопытных животных.

В результате проведения доклинических исследований подтверждена безопасность рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС).

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

PRECLINICAL RESEARCH OF PSEUDOMONAS RECOMBINANT VACCINE (PRV)

Mikhailova N.A.¹, Kaloshin A.A.¹, Zimina E.M.¹, Soldatenkova A.V.¹, Kalinichenko E.O., Poddubikov A.V.¹, Plekhanova N.G.², Victorov L.V.²

¹The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

e-mail: alex-k-1973@yandex.ru

²Volgograd Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Volgograd

The preclinical research of Pseudomonas Recombinant Vaccine have been performed. Sterility, apyrogenicity, immunogenic properties allergenicity, abnormal acute and chronic toxicity, safety of the vaccine were confirmed in experiments.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Pseudomonas Recombinant Vaccine (PRV).

We have performed the preclinical research of Pseudomonas Recombinant Vaccine that intended for the prevention of the purulent-inflammatory diseases caused by *Pseudomonas aeruginosa*. The vaccine was based on the recombinant form of outer membrane protein F (OprF) and the recombinant deleted form of the exotoxin A (toxoid) that were adsorbed on the gel of aluminum hydroxide. This composition allowed to obtain the preparation, which possesses more expressed protective properties, in comparison with the immunization by the single recombinant proteins. The efficiency index of protective properties against the live virulent culture of *P. aeruginosa* strain PA103 for the single recombinant proteins (OprF and toxoid) corresponded 2.0 – 2.3. At the same time, the efficiency index of protective properties for three experimental series of PRV corresponded 3.0 – 3.3.

I the time of the preclinical research, we showed sterility, the authenticity of the vaccine and non-contamination by DNA of producer strains. For testing of concentration of endotoxin in the preparations, we used the chromogenic LAL test. The total amount of endotoxin into the experimental series of vaccine did not exceed the threshold value. The non-pyrogenicity of PRV was demonstrated in the animal experiment. The vaccine did not cause temperature reactions when it was administered to rabbits. Vaccine had no an abnormal toxicity that was shown in experiments on mice and guinea pigs. The study of allergenic properties was carried out by the method of the hypodermic vaccination to guinea pigs. Only minor allergic reactions were identified after vaccination at a dose that was ten times to the estimated dose for humans. In reaction to the injection of recombinant vaccine into mice, there were no delayed hypersensitivity reactions.

During studying of acute and chronic toxicity of vaccine, one and ten human-dose were tested to two species of animals. For testing of acute toxicity, the preparations were administered to mice and guinea pigs on time. When testing of chronic toxicity, the preparations were administering to rats and guinea pigs every day during ten days. In the first case, checking of animals made on the 7th and 15th day, in the second case, checking of animals made on the 11th day. Animals were weighed, hematological parameters were evaluated (general and biochemical blood tests), pathomorphological and histological studies were performed. Analysis of the obtained results did not detect the significant pathological changes in the experiment animals.

Thus, during the course of this preclinical research, we confirmed the safety of Pseudomonas Recombinant Vaccine (PRV).

УДК 578.247

ИДЕНТИФИКАЦИЯ GAPR-1 И KPNA-4 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ HTLV-1 ПУТЕМ СКРИНИНГА БИБЛИОТЕКИ НОКАУТОВ GECKO

Комков Д.С.^{1,2}, Грибалева Е.О.¹, Атемасова А.А.³, Зотова А.А.^{2,3,4}, Мазуров Д.В.⁴.

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

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

³Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия;

⁴Институт биологии гена РАН, Группа клеточных и геномных технологий, Москва, Россия; Россия, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5, 119334

e-mail: dmitkomserg@gmail.com

Мы провели серию из трех независимых скринингов библиотеки нокауты GeCKO в инфекционном тесте HTLV-1. В ходе экспериментов получены пулы клеток, устойчивых к инфекции HTLV-1. Во всех трех тестах методом NGS-анализа этих популяций были обнаружены гены GAPR1 и KPNA4, продукты экспрессии которых могут рассматриваться как потенциальные факторы репликации вируса.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, библиотека нокауты GeCKO, NGS, HTLV-1, факторы репликации.

Т-лимфотропный вирус человека (HTLV-1) относится к семейству ретровирусов и обладает в отношении организма человека патогенными свойствами. HTLV-1 инфицирует как CD4, так и CD8 Т-лимфоциты, что приводит к развитию острого Т-клеточного лейкоза взрослых и тропического спастического парапареза. Известно, что для развития эффективного инфекционного процесса HTLV-1 необходимо присутствие факторов репликации, обеспечивающих перmissивность клетки для размножения вируса. Мы провели серию из трех независимых скринингов библиотеки нокауты GeCKO на основе системы CRISPR/Cas9 в инфекционном тесте путем сокультивирования HTLV-1-продуцирующих клеток MT2 и клеток Raji/CD4 и СЕМ с библиотекой нокауты в качестве мишеней. После заражения клеток библиотеки были обнаружены устойчивые к инфицированию HTLV-1 клеточные пулы. Глубокое секвенирование позволило верифицировать гены, нокауты которых могут обуславливать резистентность этих клеток к HTLV-1-инфекции. Во всех трех скринингах были выявлены популяции с нокаутами по генам GAPR-1 и KPNA-4 среди наиболее часто встречающихся. Ген GAPR-1 широко экспрессируется в иммунокомпетентных клетках. GAPR-1, будучи белком, связанным с мембраной аппарата Гольджи, регулирует внутриклеточный сигнальный путь врожденного иммунного ответа, ассоциированный с TLR-4. Такого рода регуляция может быть выражена в посттрансляционных модификациях, которые GAPR-1 способен вносить в белковые молекулы различных внутриклеточных сигнальных путей [1]. Продукт экспрессии гена KPNA-4, белок импортин α -3, участвует в процессе транспорта белков в ядро клетки. Известно, что KPNA-4 взаимодействует с интегразой HIV-1 и способствует импорту преинтеграционного комплекса вируса в ядро [2]. Мы создали дизайн гидовых РНК и донорской ДНК для последующего получения нокаутных по генам *gapr-1* и *kpna-4* линий клеток методом SORTS, разработанным ранее в нашей лаборатории. Определение функционального значения GAPR-1 и KPNA-4 в контексте HTLV-1-инфекции позволит нам обнаружить новые точки воздействия для генной анти-HTLV-1 терапии.

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

гранта РНФ 18-14-00333 «Разработка новых подходов к получению клеток с нокаутом и индуцированным нокаутном генов, кодирующих внутриклеточные или секретируемые белки».

Литература:

1. Zhou Q. et al. The Golgi-Associated Plant Pathogenesis-Related Protein GAPR-1 Enhances Type I Interferon Signaling Pathway in Response to Toll-Like Receptor 4. *Inflammation*. 2016 Apr;39(2):706-17.
2. Ao Z et al. Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication. *J Virol*. 2010 Sep;84(17):8650-63

UDC 578.247

IDENTIFICATION OF GAPR-1 AND KPNA-4 AS POTENTIAL HTLV-1 REPLICATION FACTORS BY GECKO KNOCKOUT LIBRARY SCREENING

Komkov D.S.^{1,2}, Gribaleva E.O.¹, Atemasova A.A.³, Zotova A.A.^{2,3,4}, Mazurov D.V.⁴

1. I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;
2. NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russia;
3. Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;
4. Cell and Gene Technology Group, Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia; Russia, Moscow, 34/5 Vavilova Street, 119334
e-mail: dmitkomserg@gmail.com

We performed a series of three independent screenings of GeCKO knockout library in the HTLV-1 infection assay. As a result, pools of HTLV-1-resistant cells were obtained. In all three assays GAPR1 and KPNA4 genes were detected by NGS analysis of these populations and their expression products could be considered as potential viral replication factors.

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

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) belongs to retroviruses and is pathogenic for the humans. HTLV-1 infects CD4 and CD8 T-lymphocytes and causes acute T-cell leukemia in adults and tropical spastic paraparesis. It is known that for the effective HTLV-1 infection process the presence of replication factors is necessary, ensuring cell permissiveness for viral reproduction. We conducted a series of three independent screenings of GeCKO knockout library based on the CRISPR/Cas9 system in the infection assay by co-culturing HTLV-1-producing MT2 cells and Raji/CD4 and CEM cells with knockout library as targets. After the infection of library cells HTLV-1-resistant pools were identified. Genes potentially responsible for the resistance to the HTLV-1 infection were found via deep sequencing. GAPR-1 and KPNA-4 knockout populations were among the most frequently detected in all screenings. GAPR-1 is widely expressed in immunocompetent cells. GAPR-1 is associated with the Golgi apparatus membrane and regulates the intracellular signaling pathway of the innate immune response associated with TLR-4. It can induce post-translational modifications that affect the functions of proteins of various cellular signaling pathways [1]. The product of kpna-4 gene expression, importin alpha-3, participates in nuclear transport of proteins. It is known that KPNA-4 interacts with HIV-1 integrase and provides import for preintegration complex into cell nucleus [2]. We designed gRNAs and donor DNA for GAPR-1 and KPNA-4 knockout cell lines generation using the SORTS method developed in our laboratory. Identification of GAPR-1 and KPNA-4 functional roles in HTLV-1 infection will be relevant for the future development of anti-HTLV-1 gene therapy.

The project was supported by domestic grant of 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" and Russian Science Foundation (RSF) grant 18-14-00333 "Developing novel approaches for generation of cells with knockout or inducible knockdown of genes encoding intracellular or secreted proteins".

References:

1. Zhou Q. et al. The Golgi-Associated Plant Pathogenesis-Related Protein GAPR-1 Enhances Type I Interferon Signaling Pathway in Response to Toll-Like Receptor 4. *Inflammation*. 2016 Apr;39(2):706-17.
2. Ao Z et al. Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication. *J Virol*. 2010 Sep;84(17):8650-63

УДК: 632.938, ББК: 28.707.4

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА КАТИОННОГО ПЕПТИДА И МОЛЕКУЛ МИРНК, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ IL-4 И IL-13, НА МОДЕЛИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА У МЫШЕЙ

Е.Д.Барвинская¹

¹ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Россия, 125364, Москва, г. Москва, ул. Подмосковная, д.14, кв. 69, 14,
e-mail: ed.barvinskaya@gmail.com

Изучена биологическая активность комплекса, состоящего из катионного пептида b-LTP и молекул миРНК, направленных против генов IL-4 и IL-13 на модели аллергического ринита у мышей. Курс из 7 интраназальных аппликаций комплекса приводил к нивелированию признаков аллергического ринита.

Ключевые слова: аллергический ринит, миРНК, пептид b-LTP, IL-4, IL-13

Введение. Аллергический ринит (АР) – это воспалительное заболевание слизистой оболочки носовой полости. В России заболеваемость оценивается в 10–30%. Одну из ключевых ролей в патогенезе АР играют IL-4 и IL-13. Они инициируют дифференциацию В-клеток в IgE-продуцирующие плазматические клетки, способствуют развитию гиперреактивности дыхательных путей и привлечению провоспалительных клеток – эозинофилов в участок воспаления. Учитывая значимую роль IL-4 и IL-13 в патогенезе аллергических заболеваний был разработан целый ряд препаратов на основе моноклональных антител [1]. Однако, стоит отметить, что подобные препараты сложны в разработке и поэтому дорогостоящи. Вместе с тем появляются новые способы регуляции активности биологических мишеней; один из них – технология интерференции РНК. Под интерференцией РНК понимается механизм посттранскрипционного подавления экспрессии посредством молекул малых интерферирующих РНК (миРНК) [2]. Главным препятствием для внедрения таких препаратов в практику является отсутствие эффективных, малотоксичных средств доставки миРНК в клетки-мишени [3]. Поэтому целью данной работы было изучение биологической активности комплекса, состоящего из носителя - катионного пептида b-LTP [4] и молекул миРНК, направленных против IL-4 и IL-13 на модели АР у мышей.

Материалы и методы. Для изучения биологической активности комплекса использовали ранее созданную модель АР у мышей. На фоне развившейся патологии, в течение 7 дней проводили экспериментальную терапию комплексным препаратом для чего двукратно интраназально вводили препарат 5 мкг/мышь. В качестве отрицательного контроля использовали комплекс неспецифических молекул миРНК против гена gfp (siGFP) и носителя b-LTP. Отдельная группа животных использовалась как интактный контроль. В конце эксперимента у животных была взята кровь для определения уровней специфических антител классов IgE, IgG1 и IgG2a методом ИФА. Также, оценивали: изменение продукции цитокинов IL-4 и IL-13 клетками подчелюстных лимфоузлов, стимулированных раствором овальбумина концентрацией 100 мкг/мл в течение 2 суток. Инфильтрацию провоспалительных клеток в слизистую оболочку носа оценивали гистологическими методами.

Результаты. Курс из 7 интраназальных аппликаций комплексом, состоящим из пептида-носителя b-LTP и молекул миРНК, направленных против генов провоспалительных интерлейкинов IL-4 и IL-13 в дозе 10 мкг/мышь/сут приводил к подавлению продукции указанных цитокинов лимфоцитами региональных лимфоузлов в среднем в 2 раза, что способствовало нивелированию признаков АР: снижению уровней специфических антител классов IgE и IgG1 на 50% и 25%, соответственно; снижению назальной гиперреактивности в 2 раза; снижению инфильтрации эозинофилов в слизистую оболочку носа на 30%.

Заключение. Данный комплексный препарат перспективен для дальнейшего изучения, а именно для проведения полного перечня доклинических испытаний.

1. Курс из 7 интраназальных аппликаций комплекса, состоящего из катионного пептида b-LTP и молекул миРНК, направленных против генов IL-4 и IL-13 в дозе 10 мкг/сут приводил к подавлению продукции провоспалительных цитокинов IL-4 и IL-13 лимфоцитами региональных лимфоузлов в среднем в 2 раза, что способствовало нивелированию признаков аллергического ринита: 1.1 Снижению уровней специфических антител классов IgE и IgG1 на 50% и 25%, соответственно; 1.2 Снижению назальной гиперреактивности в 2 раза; 1.3 Снижению инфильтрации эозинофилов в слизистую оболочку носа на 30%. 2. Комплекс, состоящий из катионного пептида b-LTP и молекул миРНК, направленных против генов IL-4 и IL-13 перспективен для дальнейшего внедрения в клиническую практику, а именно для проведения полного курса

доклинических исследований безопасности.

Литература:

1. Shilovskiy I. P. et al. Anticytokine therapy of allergic asthma // *Mol. Biol.* 2017. Vol. 51. № 1. P. 1–13.
2. Шиловский И. П. et al. Интерференция РНК - новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* - 2016. Vol. 79. - № 4. - С. 35–44.
3. Колоскова О. О. et al. Липосомальные средства доставки миРНК // *Биофармацевтический журнал.* - 2017. Vol. 9. - № 5. - С. 3–10.
4. Kozhikhova K. V et al. A novel peptide dendrimer LTP efficiently facilitates transfection of mammalian cells. // *Org. Biomol. Chem.* 2018. Vol. 16. № 43. P. 8181–8190.

UDC: 632.938

THE STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF THE COMPLEX OF CATIONIC PEPTIDE AND siRNA MOLECULES TARGETED TO IL-4 AND IL-13 IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC RHINITIS

E. Barvinskaya¹

¹NRC «Institute of Immunology» FMBA, Russia, 125364, Moscow, Moscow, Podmoskovnaya street, 14, 69, 14
e-mail: ed.barvinskaya@gmail.com

Biological activity of the complex consisting of cationic peptide b-LTP and siRNA molecules directed against IL-4 and IL-13 was studied in a mouse model of allergic rhinitis. A course of 7 intranasal applications of the complex led to suppression of allergic rhinitis features.

Key words: allergic rhinitis, siRNA, b-LTP, IL-4, IL-13

Introduction. Allergic rhinitis (AR) is an inflammatory disease of the nasal mucosa. In Russia, the incidence is estimated about 10–30%. One of the key roles in AR pathogenesis is played by IL-4 and IL-13. They initiate differentiation of B-cells into IgE-producing plasma cells, promote the development of airway hyperresponsiveness and the attraction of proinflammatory cells (eosinophils) to the site of inflammation. Considering significant role of IL-4 and IL-13 in the pathogenesis of allergic diseases, a number of drugs based on monoclonal antibodies have been developed [1]. However, it is worth noting that such drugs are difficult to develop and therefore expensive. At the same time new ways of regulating the activity of biological targets have been appearing. RNA interference is a mechanism of post-transcriptional suppression of gene expression by small interfering RNA molecules (siRNA) [2]. The main obstacle to the implementation of siRNA-based drugs is the lack of effective, low-toxic vectors for delivery siRNA molecules to the target cells [3]. Therefore, the goal of this study was to assess the biological activity of the complex consisting of the cationic peptide vector b-LTP [4] and siRNA molecules directed against IL-4 and IL-13 in a mouse model of AR.

Materials and methods. To study the biological activity of the complex previously developed model of AR in mice was used. During the developed of the AR pathology mice received 7 days course of intranasal applications of the complex; 2 times a day in dose 5 µg /mouse. A complex of nonspecific siRNA molecules against gfp gene (siGFP) and b-LTP in the same dose was used as a negative control. A separate group of animals was not subjected to any manipulations and was used as an intact control. At the end of the experiment animals were sacrificed to determine levels of specific IgE, IgG1 and IgG2a antibodies by ELISA. The production of IL-4 and IL-13 cytokines by cells from submandibular lymph nodes, stimulated by ovalbumin solution at concentration of 100 µg /ml for 2 days was evaluated. Infiltration of pro-inflammatory cells into the nasal mucosa was assessed by histological methods.

Results. A course of 7 intranasal applications with the complex consisting of a cationic peptide b-LTP and siRNA molecules directed against the pro-inflammatory interleukins IL-4 and IL-13 genes at dose 10 µg/mouse/day resulted in 2-fold suppression of the production of these cytokines by lymphocytes of local lymph nodes. That contributed to the suppression of AR features: a decrease in the levels of specific IgE and IgG1 antibodies by 50% and 25%, respectively; 2-fold reduction of nasal hyperreactivity; decrease in eosinophil infiltration into the nasal mucosa by 30%.

Conclusion. This complex could be a promising composition for further preclinical trials.

1. A course of 7 intranasal applications with complex consisting of cationic peptide b-LTP and siRNA molecules directed against IL-4 and IL-13 at a dose of 10 µg /day resulted in suppression of the production of pro-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 by lymphocytes of regional lymph nodes by an average of 2 times, which contributed to

leveling signs of allergic rhinitis: 1.1 Decrease in the levels of specific antibodies of the IgE and IgG1 classes by 50% and 25%, respectively; 1.2 Decrease in nasal hyperreactivity by 2 times; 1.3 Reduce eosinophil infiltration into the nasal mucosa by 30%. 2. Complex consisting of the cationic peptide vector b-LTP and siRNA molecules directed against IL-4 and IL-13 is promising for further introduction into clinical practice, namely for conducting a full course of preclinical safety studies.

References:

1. Shilovskiy I.P. et al. Anticytokine therapy of allergic asthma // *Mol. Biol.* 2017. Vol. 51, № 1. P. 1–13.
2. Shilovsky I.P. et al. RNA interference - a new approach in the treatment of allergic bronchial asthma // *Experimental and clinical pharmacology*. 2016. Vol. 79. №. 4. P. 35–44.
3. Koloskova O.O. et al. Liposomal siRNA delivery vehicles // *Biopharmaceutical journal*. 2017. Vol. 9. № 5. P. 3–10.
4. Kozhikhova K. V et al. A novel peptide dendrimer LTP efficiently facilitates transfection of mammalian cells. // *Org. Biomol. Chem.* 2018. Vol. 16, № 43. P.

УДК 577.112.083

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЦЕНТРА СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ В МОЛЕКУЛЕ АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ *LENS CULINARIS*

Романова Т.В., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: tatiana_romanova_94@mail.ru

Получены мутантные аналоги клинически значимого аллергена Len с 3 чечевицы с заменой одного или нескольких аминокислотных остатков. Проведен сравнительный анализ взаимодействия полученных белков с жирными кислотами и их способности связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией на бобовые.

Ключевые слова: липид-транспортирующие белки; гетерологичная экспрессия; аллерген

Растительные липид-транспортирующие белки (LTP) – класс небольших мультифункциональных белков, принадлежащих к семейству белков, связанных с патогенезом (PR). Считается, что участие LTP во многих процессах у растений обусловлено их способностью связывать и переносить гидрофобные молекулы. Многие представители растительных LTP являются аллергенами, играющими важную роль в развитии аллергических реакций на пыльцу, растительные продукты и латекс. Предполагается, что один и тот же участок молекулы LTP может быть вовлечен в связывание как с IgE, так и с липидами. В качестве объекта исследования был выбран липид-транспортирующий белок Len с 3 – аллерген чечевицы *Lens culinaris*, вызывающей тяжелые формы аллергических реакций как у взрослых, так и у детей.

Методом направленного мутагенеза получен ряд аналогов Len с 3 с заменами аминокислотных остатков, предположительно участвующих в формировании центра связывания лигандов и входящих в состав конформационных эпитопов. Разработана система для гетерологичной экспрессии модифицированных белков в клетках *E. coli* и их выделения с помощью методов аффинной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ. Рекомбинантные белки охарактеризованы методами SDS-электрофореза в ПААГ, времяпролётной MALDI масс-спектрометрии и автоматического N-концевого секвенирования по методу Эдмана. Проведены исследования взаимодействия полученных рекомбинантных белков с предельными и непредельными жирными кислотами, охарактеризована способность связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией на бобовые.

UDC 577.112.083

STUDY OF THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF LIGAND-BINDING SITE OF THE ALLERGEN FROM THE LENTIL LENS CULINARIS

Romanova T.V., Melnikova D.N., 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: tatiana_romanova_94@mail.ru

Mutant analogues of clinically relevant allergen Len c 3 of the lentil *Lens culinaris* with substitution of one or several amino acid residues were obtained. A comparative analysis of the interaction of the obtained proteins with fatty acids and their ability to bind specific IgE from the sera of patients with food allergy to legumes was carried out.

Key words: lipid transfer proteins; heterologous expression; allergen

Plant lipid transfer proteins (LTPs) are a class of small multifunctional proteins belonging to the family of pathogenesis-related (PR) proteins. Involvement of LTPs in many processes in plants is considered to be associated with their ability to bind and transfer hydrophobic molecules. Many representatives of plant LTPs are allergens, which play an important role in the development of allergic reactions to pollen, plant products, and latex. It is assumed that the same site of the LTP molecule may be involved in both IgE- and lipid-binding.

Lipid transfer protein Len c 3 is an allergen of the lentil *Lens culinaris*, causing severe allergic reactions in both adult and pediatric patients. A number of analogs of Len c 3 with replacements of amino acid residues, presumably involved in the formation of the ligand-binding site and included in the conformational epitopes, were obtained by site-directed mutagenesis. The system was developed for heterologous expression of modified proteins in cells of the *E. coli* and their isolation by immobilized metal affinity chromatography and RP-HPLC. The obtained recombinant proteins were characterized by SDS-PAGE, MALDI mass spectrometry, and automatic N-terminal microsequencing. Their interaction with saturated and unsaturated fatty acids was studied, and an ability to bind specific IgE from the sera of patients with food allergy to legumes was characterized.

УДК 577.29, 577.181.5

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ПОЛИФЕМУЗИНА III

Маргграф М.Б., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук- 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
 e-mail: thpcb92@mail.ru

На панели опухолевых и нормальных клеточных линий человека изучены цитотоксические свойства нового бета-спилечного антимикробного пептида полифемузина III. Исследован механизм действия пептида.

Ключевые слова: врождённый иммунитет; антимикробные пептиды; катионные бета-спилечные пептиды; цитотоксический эффект; противоопухолевая активность.

Антимикробные пептиды (АМП) относятся к числу молекулярных факторов системы врождённого иммунитета многоклеточных организмов. Для беспозвоночных роль АМП особенно важна ввиду того, что эти животные лишены адаптивного иммунитета. Полифемузины и тахиплезины – гомологичные бета-спилечные пептиды различных видов мечехвостов, древнейших морских членистоногих из класса меростомовых (Merostomata). В данной работе были изучены цитотоксические свойства нового пептида мечехвостов полифемузина III в сравнении с полифемузином I, полифемузином II, тахиплезином I, тахиплезином II и тахиплезином III. Величина цитотоксического эффекта в отношении опухолевых и нормальных клеток человека оценивалась с помощью МТТ-теста и последующего расчета значений концентраций по-

лумахсимального ингибироваания (IC_{50}). Среди исследуемых пептидов полифемузин III обладал наиболее выраженными цитотоксическими свойствами. Значения IC_{50} , определенные на опухолевых и нормальных клеточных линиях, находились в диапазоне от 2,5 до 9,9 мкМ. По сравнению с полифемузином III, полифемузин I и полифемузин II проявляли менее выраженный эффект, значения IC_{50} составили от 7,2 до 16,0 мкМ и от 7,2 до 18,3 мкМ, соответственно. Показатели IC_{50} для тахиплезинов на опухолевых и нормальных клетках находились в диапазоне от ~5 до 30 мкМ, таким образом, тахиплезины обладали менее выраженными цитотоксическими свойствами по сравнению с полифемузином III. Наиболее чувствительной к действию полифемузина III являлась клеточная линия острого промиелоцитарного лейкоза HL-60, для которой значение IC_{50} составило 2,5 мкМ.

Для полифемузина III значение концентрации, вызывающей гемолиз 50% эритроцитов (HC_{50}), составило 46 мкМ и в 18 раз превышало значение IC_{50} , определенное на клетках HL-60 для данного пептида. Другие исследуемые полифемузины и тахиплезины в максимальных концентрациях (100 мкМ) вызывали менее выраженный лизис эритроцитов, не превышающий 50%.

Для исследования механизма цитотоксического действия полифемузина III было проведено предварительное окрашивание клеток HL-60 трипановым синим. Установлено, что под действием полифемузина III по прошествии 15 мин инкубации происходило значительное разрушение клеток, при этом цитотоксический эффект зависел от концентрации пептида и не зависел от времени. Двойное окрашивание с последующей проточной цитофлуориметрией дало основание полагать, что полифемузин III вызывает неапоптотическую гибель клеток HL-60.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

UDC 577.29, 577.181.5

STUDY ON CYTOTOXIC EFFECTS OF THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE POLYPHEMUSIN III

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*

Cytotoxic effects of the novel beta-hairpin antimicrobial peptide polyphemusin III were examined against human cancer and normal cell lines. Mechanism of the peptide action was investigated.

Key words: innate immunity; antimicrobial peptides; cationic beta-hairpin peptides; cytotoxic effect; anticancer activity.

Antimicrobial peptides (AMPs) are among the most important components of the innate immune system of multicellular organisms. The role of AMPs is of particular importance for invertebrates as these animals lack acquired immunity. Polyphemusins and tachyplesins are homologous beta-hairpin peptides of the different horseshoe crab species, the most ancient marine arthropods from the class Merostomata. In this study, cytotoxic properties of the novel horseshoe crab peptide polyphemusin III were examined in comparison with those of polyphemusin I, polyphemusin II, tachyplesin I, tachyplesin II, and tachyplesin III. Cytotoxicity against human cancer and normal cells was assessed using MTT-test with further determination of half-maximal inhibitory concentrations values (IC_{50}). Among the investigated peptides polyphemusin III was the most active peptide. The IC_{50} values ranged from 2.5 to 9.9 μ M. Compared to polyphemusin III, polyphemusin I and polyphemusin II showed lower cytotoxic effects, the IC_{50} values ranged from 7.2 to 16.0 μ M and from 7.2 to 18.3 μ M, correspondingly. The IC_{50} values for tachyplesins ranged from ~5 to 30 μ M, indicating that these peptides were less cytotoxic compared to polyphemusin III. The acute promyelocytic leukemia HL-60 cell line was the most sensitive to polyphemusin III, the IC_{50} was of 2.5 μ M.

The half-hemolysis concentration (HC_{50}) for polyphemusin III was of 46 μ M and exceeded 18-fold its IC_{50} value measured on HL-60 cells. Other tested polyphemusins and tachyplesins at the maximal concentration (100 μ M) caused lower erythrocytes lysis, not exceeding 50%.

In order to investigate the mechanism of polyphemusin III cytotoxic action, we first performed the trypan blue staining of HL-60 cells. After 15 min of incubation the significant permeabilization of cells was observed, the cytotoxic effect depended on the peptide concentration but not on the incubation time. Annexin V-FITC / propidium iodide double staining with subsequent flow cytometry led to the supposition that polyphemusin III induced non-apoptotic death of HL-60 cells.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 14-50-00131).

УДК 577.1

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Берлина А.Н., Бартош А.В., 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: bartoshlab@yandex.ru

Разработаны иммунохроматографические методики определения антибиотиков группы пенициллина и тетрациклина в сыворотке крови человека. Проведена их апробация как средств мониторинга изменений уровня антибиотиков в крови.

Ключевые слова: иммунохроматография, ампициллин, тетрациклин, контроль эффективности антибиотикотерапии

Представлены результаты изучения факторов, влияющих на взаимодействие антиген – антитело при иммуноанализе проб сывороток крови человека. Выбраны условия связывания антител, конъюгированных с золотыми наночастицами, с определяемым аналитом в вязких средах. Разработаны иммунохроматографические методики определения антибиотиков группы пенициллина и тетрациклина в сыворотке крови человека. Получены градуировочные зависимости интенсивности аналитического сигнала (интенсивности окрашивания) от концентрации определяемого соединения. Определены аналитические характеристики разработанных иммунохроматографических методик. Показана пригодность предложенного подхода для мониторинга изменений уровня антибиотиков в крови.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.613.21.0061 от 17.07.2017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61317X0061.

UDK 577.1

IMMUNOCHEMICAL DETERMINATION OF ANTIBIOTICS IN HUMAN BLOOD SERUM

Berlina A.N., Bartosh 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 prospect 33
e-mail: bartoshlab@yandex.ru

Immunochromatographic methods for the determination of penicillin and tetracycline antibiotics in human serum have been developed. The methods were tested as a means of monitoring changes in the level of antibiotics in the blood.

Key words: immunochromatography, ampicillin, tetracycline, monitoring the effectiveness of antibiotic therapy

The results of the study of factors affecting the antigen - antibody interaction in the course of immunoassay of human serum samples are presented. The conditions for the binding of antibodies conjugated to gold nanoparticles with the target analyte in viscous media were selected. Immunochromatographic techniques for the determination of antibiotics from penicillin and tetracycline groups in human serum have been developed. Calibration dependences of the analytical signal (staining intensity) from the concentration of target compounds were obtained. Analytical characteristics of the developed immunochromatographic techniques were determined. The suitability of the proposed approach for monitoring changes in the level of antibiotics in the blood was shown.

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 14.613.21.0061 by 17.07.2017, unique identification number of the project RFMEFI61317X0061).

УДК: 577.112.083

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *PICHA PASTORIS* – ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ГМ-КСФ ЧЕЛОВЕКА

Пыхтина М.Б., Романов В.П., Беклемишев А.Б.

НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия
630117, Новосибирск, ул. Тимакова 2
e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

В настоящей работе сконструирован штамм *P. pastoris*, обеспечивающий эффективный синтез и секрецию рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (рчГМ-КСФ). Разработан способ хроматографической очистки рчГМ-КСФ.

Ключевые слова: *P. pastoris*, рчГМ-КСФ, клонирование, хроматография

ГМ-КСФ является цитокином, играющим ключевую роль в пролиферации и дифференцировке гранулоцитов и макрофагов из гематопозитических прогениторных клеток костного мозга [1]. В клинике препараты рекомбинантного ГМ-КСФ применяются в комбинации с химио- и радиотерапией при лечении онкобольных [2], а также при трансплантации костного мозга. Выпускаемые в настоящее время коммерческие препараты рекомбинантного ГМ-КСФ человека получают синтезом в клетках *E. coli* (препарат Молграмостим) или дрожжей *S. cerevisiae* (препарат Сарграмостим). Синтезируемый в этих системах ГМ-КСФ имеет существенные отличия от нативного цитокина (более низкая биологическая активность, иммуногенность). *P. pastoris* как продуцент позволяет получать рекомбинантные белки с высоким выходом, с биологическими свойствами и типом гликозилирования, сходными с таковыми у человека.

В этой связи, целью настоящей работы явилось создание штамма *P. pastoris* – продуцента рекомбинантного ГМ-КСФ человека, а также разработка способов очистки этого цитокина.

Синтетический ген ГМ-КСФ человека, оптимизированный для экспрессии в дрожжах *P. pastoris*, был клонирован в составе плазмидного вектора pPICZ-alphaA (Invitrogen, США) в клетках *E. coli* BL 21 (DE3). Рекомбинантной плазмидой pPICZ-alphaA/ГМ-КСФ трансформировали клетки *P. pastoris* шт. X-33. Скрининг трансформантов проводили на агаризованной среде, содержащей 2000 мкг/мл зеоцина. Выросшие колонии анализировали на способность секретировать рчГМ-КСФ с помощью их культивирования в глубоководном планшете в присутствии 1% метанола и последующего анализа образцов электрофорезом в ДСН-ПААГ. Клон, проявивший максимальный уровень индуцированного синтеза рчГМ-КСФ, использовали для наработки белка в колбах на орбитальном шейкере. Культивирование штамма проводили в среде BMGY в присутствии неионного детергента Твин 20 (0,2%). Далее клетки осаждали центрифугированием, а в надосадочную жидкость вносили сульфат аммония до 50% насыщения. Преципитаты белка осаждали центрифугированием, растворяли в 25мМ ацетатном буфере, pH 4.5 и после диализа подвергали последовательной 2-х ступенчатой ионообменной хроматографии на колонках с DEAE BioPro Q75 (YMC GMBH) и CM Сефарозой FF (GE). Чистота конечного препарата ГМ-КСФ составила не менее 95%. Белок мигрировал в ПААГ диффузной полосой в диапазоне молекулярных весов от ~ 20 до 40 кДа, что объясняется разной степенью его гликозилирования. Концентрацию полученного рчГМ-КСФ определяли методом ИФА с использованием набора «GM-CSF-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). В дальнейшем планируется определение биологической активности полученного рчГМ-КСФ на культуре клеток человека.

Таким образом, получен штамм *P. pastoris* – продуцент зрелого рчГМ-КСФ и разработан способ очистки рекомбинантного цитокина.

Литература:

1. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells // Nature. 1989. Vol. 339. P. 27–30.
2. Lifton R., Bennet J.M. Clinical use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in neutropenia associated with malignancy // Hematol. Oncol. Clin. North. Amer. 1996. Vol. 10. P. 825-839.

UDC: 577.112.083

CONSTRUCTION OF THE YEAST *PICHIA PASTORIS* STRAIN - PRODUCER OF THE RECOMBINANT HUMAN GM-CSF

Pykhtina M.B., Romanov V.P., Beklemishev A.B.

Research Institute of Biochemistry FIC FTM, Novosibirsk, Russia
 630117, Novosibirsk, Timakova str., 2
 e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

In this work, *P. pastoris* strain was designed to ensure efficient synthesis and secretion of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF). Methods have been developed for chromatographic purification of rhGM-CSF.

Key words: *P. pastoris*, rhGM-CSF, cloning, chromatography

GM-CSF is a cytokine that plays a key role in the proliferation and differentiation of granulocytes and macrophages from the hematopoietic progenitor cells of the bone marrow [1]. The preparations of recombinant GM-CSF are used in the clinic in combination with chemo- and radiotherapy for the treatment of cancer patients [2], as well as for bone marrow transplantation. Available commercial preparations of recombinant human GM-CSF are obtained by synthesis in *E. coli* cells (Molgramostim drug) or in *S. cerevisiae* yeast cells (Sargramostim drug). GM-CSF (s) synthesized in these systems have significant differences from the native cytokine; in particular, they exhibit lower biological activity and are characterized by immunogenicity. *P. pastoris* strains as a producers allows obtaining recombinant proteins with high yield, with biological properties and type of glycosylation, similar to those in humans.

In this regard, the aim of this work was the creation of *P. pastoris* strain - a producer of recombinant human GM-CSF, as well as the development of methods for purification of this cytokine.

A synthetic human GM-CSF gene optimized for expression in *P. pastoris* yeast was cloned in the pPICZ-alphaA (Invitrogen, USA) plasmid vector in *E. coli* BL 21 (DE3) cells. *P. pastoris* X-33 cells were transformed with the pPICZ-alphaA/GM-CSF recombinant plasmid. Screening of the transformants was carried out on agar medium containing 2000 µg/ml of zeocin. The grown colonies were analyzed for their ability to secrete rhGM-CSF by cultivating them in a deep-well plate in the presence of 1% methanol and subsequent analysis of samples by SDS-PAGE. The clone, which showed the maximum level of induced synthesis of rhGM-CSF, was used for protein production in flasks in an orbital shaker. Cultivation of the strain was performed in BMGY medium in the presence of a non-ionic detergent Tween 20 (0.2%). The cells were precipitated then by centrifugation, and ammonium sulfate was added to the supernatant to 50% of saturation. The protein precipitates were sedimented by centrifugation, dissolved in 25 mM acetate buffer, pH 4.5, and after dialysis were subjected to sequential 2-step ion exchange chromatography on columns with DEAE BioPro Q75 (YMC GMBH) and CM Sepharose FF (GE). The purity of the final rhGM-CSF preparation was at least 95%. The protein migrated in the PAAG as a diffuse band in the molecular weight range from ~ 20 to 40 kDa; it is explained by the different degree of its glycosylation. The concentration of the purified rhGM-CSF was determined by ELISA using the GM-CSF-ELISA-BEST kit (Vector-Best JSC, Novosibirsk). In the future, it is planned to determine the biological activity of the obtained rhGM-CSF using human cell culture.

Thus, the *P. pastoris* strain producing the mature human GM-CSF was obtained, and a method for purification of the recombinant cytokine was developed.

References:

1. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells // *Nature*. 1989. Vol. 339. P. 27–30.
2. Lifton R., Bennet J.M. Clinical use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in neutropenia associated with malignancy // *Hematol. Oncol. Clin. North. Amer.* 1996. Vol. 10. P. 825-839.

УДК 616.921.5

ЛИНЕЙНЫЕ И ДЕНДРИМЕРНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИВИРУСНЫЕ СРЕДСТВА

Шиловский И.П., Андреев С.М., Кожихова К.В., Барвинская Е.Д., Хаитов М.Р.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия
115478, г. Москва, Каширское шоссе, дом 24
e-mail: ip.shilovsky@nrcii.ru

Были спроектированы линейные и дендримерные катионные пептиды и изучена их противовирусная активность в отношении респираторно-синцитиального вируса (РСВ). Наибольшей противовирусной активностью в отношении РСВ обладал дендримерный пептид LPT, снижающий титр вируса в 100 раз.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальный вирус, катионные пептиды

Введение. Один из самых распространенных вирусных патогенов - респираторно-синцитиальный вирус (РСВ). Не существует эффективных, безопасных и при этом доступных средств его лечения и профилактики. Создаются препараты на основе моноклональных антител, молекул РНК и наночастиц [1–3] an RSV-neutralizing monoclonal antibody, is used clinically to prevent serious RSV-related respiratory disease in high-risk infants. Motavizumab, an affinity-optimized version of palivizumab, was developed to improve protection against RSV. These antibodies bind RSV F protein, which plays a role in virus attachment and mediates fusion. Determining how these antibodies neutralize RSV is important to help guide development of new antibody drugs against RSV and, potentially, other viruses. This study aims to uncover the mechanism(s). Природные пептиды (дефензины и кателицидины) являются неотъемлемой частью врожденного иммунного ответа с противовирусными свойствами. Однако их получение из природных источников является дорогостоящим. Существует возможность искусственного синтеза сходных по структуре пептидов. В связи с этим главной целью данной работы было проектирование пептидов с различной структурой (линейной и разветвленной) и изучение их противовирусной активности в отношении РСВ.

Материалы и методы. Синтезировано 16 пептидов с катионными свойствами: SP-191, NC-777, NC-783, NC-810, NC-788, LO-7, NC-786, NC-771, NC-762, KO-1, NC-770, NC-785, IA-2, AS-543, NC-737, LPT. Токсичность изучали с помощью МТТ-теста. Противовирусную активность оценивали *in vitro*. Для этого пептиды в нетоксических концентрациях смешивали с РСВ штамм А2 и инкубировали в течение 1 часа после чего осуществляли титрование на монослое клеток МА-104. В качестве контроля вирус инкубировали с физиологическим раствором. После инкубации в течении 3-5 суток оценивали цитопатическое действие вируса на клетки методом световой микроскопии.

Результаты. Пептиды NC-783 и NC-810 проявили себя как наиболее цитотоксичные; IC_{50} составила $0,04 \pm 0,01$ и $0,05 \pm 0,01$ мг/мл, соответственно. Пептиды LO-7, AS-543 и NC-785 менее токсичны; значения IC_{50} составили $0,94 \pm 0,15$, $1,85 \pm 0,05$ и $2,72 \pm 1,12$ мг/мл, соответственно. В результате исследования противовирусной активности показано, что инкубация РСВ с 12 из 16-ти исследуемых пептидов: SP-191, NC-777, NC-783, NC-788, LO-7, NC-786, KO-1, NC-785, IA-2, AS-543 NC-737 и LPT статистически значимо снижала титр вируса в среднем в 10 раз. При этом максимальной противовирусной активностью обладают линейные пептиды NC-737 и KO-1, которые снижали титр РСВ в 14 и 25 раз, соответственно, а также дендримерный пептид LPT, снижавший титр РСВ в 100 раз. Такая высокая противовирусная активность LPT вероятно обусловлена значительным положительным зарядом пептида, который обеспечивается за счет наличия в его составе 8 остатков аргинина.

Заключение. Наибольшей противовирусной активностью в отношении РСВ обладает дендримерный пептид LPT, снижающий титр вируса в 100 раз. Антивирусные свойства LPT проявляет в диапазоне нетоксичных концентраций, что делает его перспективным для дальнейшего исследования. Работа поддержана грантом РНФ 18-74-10002.

Литература:

1. Huang K. et al. Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion // J. Virol. 2010. Vol. 84, № 16. P. 8132–8140.
2. Osminkina L.A. et al. Porous silicon nanoparticles as scavengers of hazardous viruses // J. Nanoparticle Res. 2014. Vol. 16, № 6.
3. Хаитов М.Р. et al. Интерференция РНК. Новые подходы к разработке противовирусных препаратов // Иммунология. 2010. Vol. 31, № 2. P. 69–76.

UDC 616.921.5

LINEAR AND DENDRIMERIC PEPTIDES AS PERSPECTIVE ANTI-VIRAL AGENTS

Shilovskiy I.P., Andreev S.M., Kozhihova K.V., Barvinskaia E.D., Khaitov M.R.

*NRC «Institute of Immunology» FMBA, Moscow, Russia
115478, Moscow, Kashirskoe highway, 24
e-mail: ip.shilovsky@nrcii.ru*

Linear and dendrimeric cationic peptides were designed and their antiviral activity against respiratory syncytial virus (RSV) was studied. Dendrimeric peptide LPT, which decreased virus titer 100 times, had the highest antiviral activity against RSV.

Key words: respiratory syncytial virus, cationic peptides

Introduction. Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the most common viral pathogens. There are no effective, safe and at the same time inexpensive ways of treatment/prevention of RSV-infection. Drugs based on monoclonal antibodies, RNA molecules, and nanoparticles are being under development [1–3]. Natural peptides (defensins and cathelicidins) possessing antiviral properties are an important part of the innate immune system. However, its purification from natural sources is expensive. There is a possibility of artificial synthesis of peptides with similar structure. In this regard the main aim of this study was to design peptides with different structures (linear and branched) and assessment their antiviral activity against RSV.

Materials and methods. 16 peptides with cationic properties were synthesized: SP-191, NC-777, NC-783, NC-810, NC-788, LO-7, NC-786, NC-771, NC-762, KO-1, NC-770, NC-785, IA-2, AS-543, NC-737, LTP. Toxicity was studied using the MTT test. Antiviral activity was evaluated *in vitro*. These peptides in non-toxic concentrations were mixed with RSV strain A2 and incubated for 1 hour, after that the mixture titrated on a MA-104 cells monolayer. The virus incubated with saline served as a control. After incubation for 3-5 days the cytopathic effect of the virus on cells was evaluated by light microscopy.

Results. The peptides NC-783 and NC-810 were most cytotoxic; IC_{50} were $0,04 \pm 0,01$ and $0,05 \pm 0,01$ mg/ml, respectively. LO-7, AS-543 and NC-785 peptides were less toxic; IC_{50} were $0,94 \pm 0,15$; $1,85 \pm 0,05$, and $2,72 \pm 1,12$ mg/ml, respectively. The study of antiviral activity showed that RSV incubation with 12 out of 16 peptides: SP-191, NC-777, NC-783, NC-788, LO-7, NC-786, KO-1, NC-785, IA-2, AS-543 NC-737 and LTP significantly reduced virus titer in about 10 times. At the same time linear peptides NC-737 and KO-1 reduced the titer of RSV by 14 and 25 times, respectively. Dendrimeric peptide LTP maximally reduced the RSV titer in 100 times. Such potent antiviral activity of LTP is probably due to the substantial positive charge of the peptide which is provided by the presence of 8 arginine residues.

Conclusion. The dendrimeric peptide LPT has the highest antiviral activity against RSV and reduces the virus titer in 100 times. The antiviral properties of LTP is exhibited in non-toxic concentrations, that makes it promise for further research. Supported by RSF No 18-74-10002.

References.

1. Huang K. et al. Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion // *J. Virol.* 2010. Vol. 84, № 16. P. 8132–8140.
2. Osminkina L.A. et al. Porous silicon nanoparticles as scavengers of hazardous viruses // *J. Nanoparticle Res.* 2014. Vol. 16, № 6.
3. Khaitov M.R. et al. RNA interference. New approaches to the development of antiviral drugs // *Immunology.* 2010. Vol. 31, № 2. P. 69–76.

УДК 577.112.083

НОВЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ДЕФЕНСИНА ЧЕЧЕВИЦЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Финкина Е.И.¹, Канушкина М.Д.², Богданов И.В.¹, Егорова Е.А.³, Матвеевская Н.С.³, Овчинникова Т.В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

³Федеральное бюджетное учреждение науки Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

e-mail: finkina@mail.ru

Показано, что дефенсин чечевицы Lc-def обладает противогрибковой активностью в отношении клинических штаммов *Candida albicans*, *C. krusei* и *C. glabrata*. Получены данные, свидетельствующие о присутствии в сыворотках пациентов с пищевой аллергией на бобовые растения специфичных к дефенсину чечевицы антител IgE.

Ключевые слова: дефенсин чечевицы, врожденный иммунитет, противогрибковая активность, *Candida*, аллерген, специфичные IgE

Дефенсины составляют один из классов пептидов системы врожденного иммунитета растений, которые обеспечивают их выживание и адаптацию в неблагоприятных условиях. Дефенсины обладают широким спектром биологической активности, защищают растения от воздействия абиотических факторов стресса, фитопатогенных микроорганизмов, насекомых и паразитарных растений. Последние данные показывают, что некоторые дефенсины растений ингибируют рост патогенных для человека бактерий и грибов, а также проявляют свойства аллергенов. В связи с этим растительные дефенсины могут найти применение в медицине в качестве прототипов новых антимикробных препаратов, а также могут быть использованы в аллергологии для создания современных диагностических тест-систем и аллерговакцин.

Ранее в пророщенных семенах чечевицы *Lens culinaris* нами был обнаружен новый дефенсин, названный Lc-def. Было показано, что Lc-def ингибирует рост филаментных грибов, вызывающих различные заболевания растений, но не влияет на рост грамположительных и грамотрицательных бактерий. В данной работе с использованием рекомбинантного аналога дефенсина чечевицы, полученного путем гетерологической экспрессии в клетках *Escherichia coli*, было проведено исследование способности данного пептида влиять на рост патогенных штаммов грибов рода *Candida*, являющихся причиной развития местных и системных кандидозов у людей с ослабленным иммунитетом. Показано, что Lc-def обладает противогрибковой активностью в отношении клинических штаммов *Candida albicans*, *C. krusei* и *C. glabrata*. Установлено, что данный пептид оказывает ингибирующее действие, замедляет рост и размножение штаммов дрожжеподобных грибов.

Предсказание потенциальной аллергенности дефенсина чечевицы было проведено посредством анализа первичной структуры пептида с помощью сервисов FARRP (<http://www.allergenonline.org/>) и Allermatch™ (www.allermatch.org). Lc-def имеет около 70% идентичных аминокислотных остатков (а.о.) с двумя зарегистрированными в международной базе данных IUIS пищевыми аллергенами арахиса Ara h 13.0101 и Ara h 13.0102, принадлежащими к классу дефенсинов. Кроме того, первичные структуры этих аллергенов и дефенсина Lc-def содержат идентичный участок из восьми последовательно расположенных а.о. Аллергенные свойства Lc-def были подтверждены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Показано, что в сыворотках пациентов с пищевой аллергией на бобовые растения, в частности на арахис, присутствуют специфичные к дефенсину чечевицы антитела IgE. Это может свидетельствовать о том, что Lc-def является новым пищевым аллергеном чечевицы класса дефенсинов.

UDC 577.112.083

NEW PROPERTIES OF RECOMBINANT DEFENSIN FROM LENTIL AND PROSPECTS FOR ITS APPLICATION

Finkina E.I.¹, Kanushkina M.D.², Bogdanov I.V.¹, Egorova E.A.³, Matveevskaya N.S.³, Ovchinnikova T.V.^{1,2}

¹M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Russia, 117997, Moscow, st. Miklukho-Maklaya, 16/10

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russia, 119991, Moscow, 8 Trubetskaya st., bld.2

³G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Russia, 125212, Moscow, Admiral Makarov st., 10

e-mail: finkina@mail.ru

It is shown that lentil defensin Lc-def has antifungal activity against clinical strains of *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. glabrata*. Data indicating the presence of specific IgE antibodies to lentil defensin in the sera of patients with food allergy to legumes are obtained.

Key words: lentil defensin, innate immunity, antifungal activity, *Candida*, allergen, specific IgE

Defensins are members of a larger group of plant innate immune system peptides, which ensure their survival and adaptation to adverse conditions. Defensins possess a wide spectrum of biological activity, protect plants from abiotic stress, phytopathogenic microorganisms, insects and parasitic plants. Recent data show that some plant defensins inhibit the growth of bacteria and fungi pathogenic to humans, and also exhibit allergenic properties. In this regard, plant defensins can be used in medicine as prototypes of new antimicrobial agents, and also in allergology to create modern diagnostic test systems and allergy vaccines.

Earlier we discovered a new defensin, called Lc-def, in the germinated lentil *Lens culinaris* seeds. It was shown that Lc-def inhibited the growth of filamentous fungi that cause various plant diseases, but did not affect gram-positive and gram-negative bacteria growth. In this work, using the recombinant lentil defensin, obtained by heterologous expression in *Escherichia coli* cells, the ability of this peptide to influence on the growth of pathogenic strains of *Candida* fungi, causing local and systemic candidiasis in people with weakened immune system, was studied. It was shown that Lc-def had antifungal activity against clinical strains of *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. glabrata*. The peptide had an inhibitory effect and slowed down the growth of yeast-like fungal strains.

Prediction of the potential allergenicity of lentil defensin was carried out by analyzing the primary structure of the peptide using the FARRP (<http://www.allergenonline.org/>) and Allermatch™ (www.allermatch.org) services. Lc-def had about 70% identical amino acids (a.a.) with two peanut allergens, Ara h 13.0101 and Ara h 13.0102, registered in the IUIS international database and belonging to the plant defensins class. Besides, Lc-def and the mentioned allergens had at least one match of eight consistent a.a. Allergenic properties of Lc-def were confirmed using enzyme-linked immunosorbent assay. It has been shown that the specific IgE to lentil defensin were present in the sera of patients with food allergy to legumes, in particular to the peanut. This may indicate that Lc-def is a new lentil allergen, belonging to the class of plant defensins.

УДК 615.281.9

ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВАГИНИТОВ СМЕШАННОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ПЕНТАДЕФЕНИНА И ПРОТИВОВИРУСНОГО ПЕПТИДА АЛЛОФЕРОНА

Колобов А.А., Колодкин Н.И., Стефаненко Л.И., Афонина И.В., Смирнова М.П., Колобов А.А.

ООО «НПФ Верта», Санкт-Петербург, Россия

e-mail: alexey.kolobov.spb@gmail.com

Разработан препарат в форме геля для лечения вагинитов смешанной этиологии, в том числе вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами бактерий. По результатам доклинических исследований препарат эффективно купирует инфекционный процесс в моделях бактериального и вирусного вагинитов.

Ключевые слова: антимикробный пептид, аллоферон, вагинит, вагиноз, кольпит

Вагиниты (кольпиты) – группа заболеваний полиэтиологической природы, сопровождающихся воспалением слизистой оболочки влагалища. Их симптомами являются серозные или гнойные выделения, зуд, боль, жжение, усиливающиеся при мочеиспускании. Вагинит хотя бы единожды в жизни диагностируется у 15 - 80% женщин в различных популяциях. В более чем в 50% случаев заболевание рецидивирует в течение года.

Инфекционные вагиниты в большинстве случаев вагиниты вызываются специфическими возбудителями (гонококк, трихомонада, хламидия, микопlasма, уреаплазма), с развитием вторичной условно-патогенной инфекции (стафилококк, стрептококк, гарднерелла, дрожжеподобные грибки рода кандиды и др.). Вагинит часто протекает на фоне обострения латентной папилломавирусной или герпесвирусной инфекции.

Лечение вагинитов осложняется их комплексной природой, а также распространением штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам, традиционно применяемых при лечении вагинитов – клиндамицину и метронидазолу. Поэтому представляется перспективным использование для их лечения средств на основе биоцидов широкого спектра действия, например, антимикробных пептидов.

Целью данной работы стала разработка и доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственного препарата для лечения вагинитов смешанной этиологии.

Разработанное лекарственное средство имеет форму геля для интравагинального нанесения и содержит 2 активных компонента. Первый – синтетический пептид Пентадефенин (1 мг/мл), обладающий антибактериальным и антигрибковым действием за счёт нарушения целостности их клеточных мембран. Второй – синтетический пептид Аллоферон (1 мг/мл), обладающий противовирусным действием за счёт индукции синтеза интерферонов и стимуляции NK-клеток. Препарат был испытан на моделях бактериального и вирусного вагинитов.

В модели бактериального вагинита на мышах, вызванного интравагинальным введением культур *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*, препарат активно подавляет рост патогенных бактерий уже в первые дни после введения, обеспечивает повышение уровня бактериоспецифических секретируемых IgA. Также он снижает совокупное содержание условно-патогенных бактерий *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* и *Porphyromonas spp.* во влагалище мышей и способствует восстановлению лактобациллярной нормофлоры влагалища. Кроме того, препарат купирует воспаление матки мышей на фоне инфекции.

В модели летального герпетического вагинита на мышах, вызванного интравагинальным введением культуры *Herpes simplex 2* типа, препарат снижает смертность животных в 2 раза. Использование препарата приводит к более высоким показателям противовирусной защиты при профилактическом использовании.

Препарат не токсичен для грызунов и зайцеобразных при интравагинальном нанесении в дозе 2 г/кг, что в 10000 раз превосходит предполагаемую человеческую терапевтическую дозу. Препарат также не обладает хронической токсичностью, не оказывает местно-раздражающего действия, апирогенен.

Таким образом, разработанный препарат эффективно купирует инфекционный процесс во влагалище и может быть использован в терапии вагинитов смешанной бактериально-вирусной этиологии.

UDC 615.281.9

MEDICATION FOR MIXED ETIOLOGY VAGINITIS TREATMENT BASED ON ANTIMICROBIAL PEPTIDE PENTADEFENINE AND ANTIVIRAL PEPTIDE ALLOFERON

Kolobov A.A., Kolodkin N.I., Stefanenko L.I., Afonina I.V., Smirnova M.P., Kolobov A.A.

«RPC Verta» Ltd., Saint-Petersburg, Russia
e-mail: alexey.kolobov.spb@gmail.com

We developed a gel medication for treatment of mixed etiology vaginitis including cases caused by antibiotic-resistant bacteria. Preclinical trials showed that drug efficiently treats the infection in bacterial and viral vaginitis models.

Key words: antimicrobial peptide, alloferon, vaginitis, colpitis

Vaginitises (colpitis) form a group of diseases with different etiologies, characterized by inflammation of vaginal mucosa. Their symptoms are serous or purulent discharges, itch, pain, burning, worsening with urination. Vaginitis is diagnosed at least once in the lifetime in 15 - 80% of women depending on population. In more than 50%

cases disease relapses within a year after treatment.

Infectious vaginitises in most cases are caused by specific pathogens (gonococcus, trichomonad, chlamydia, mycoplasma, ureaplasma), with development of secondary opportunistic infection (staphylococcus, streptococcus, gardnerella, yeast-like fungi candida etc.). Vaginitis is often accompanied by exacerbation of latent papillomavirus or herpesvirus infections.

Vaginitises treatment is complicated with their complex nature and also with spreading of bacterial strains resistant to antibiotics commonly used for vaginitises treatment – clindamycin and metronidazole. Thus for their treatment it seems promising to use broad spectrum biocides like antimicrobial peptides.

The aim of this work was development and preclinical trials of efficiency and safety of medication for treatment of mixed etiology vaginitises.

Developed medication is a gel for intravaginal application including 2 active compounds. The first is the synthetic peptide Pentadefenine (1 mg/ml) having the antibacterial and antimicotic activity as it disrupts their cellular membranes. The second is synthetic peptide Alloferon (1 mg/ml) having the antiviral activity as it induces interferones synthesis and activates NK-cells.

In the model of bacterial vaginitis in mice, induced by intravaginal administration of *Staphillococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* cultures, the drug actively inhibits the growth of pathogenic bacteria in the days right after administration, increases the level of bacteriospecific secreted IgA. It also reduces the total of opportunistic bacteria *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* and *Porphyromonas spp.* in mice vagina and contributes to the restoration of normal vaginal lactobacilli flora. In addition, the drug suppresses inflammation of mice uterus caused by infection.

In the model of lethal herpetic vaginitis in mice, induced by intravaginal introduction of *Herpes simplex* type 2 culture, the drug reduces animal mortality by 2 times. The prophylactic use of the drug provides higher rates of antiviral protection.

The drug is non-toxic to rodents and lagomorphs when administered intravaginally at a dose of 2 g / kg, which is 10,000 times higher than the intended human therapeutic dose. The drug also has no chronic toxicity, local irritant effect and it is apyrogenic.

Thus, the developed drug effectively suppresses the infectious process in the vagina. It can be used in the treatment of vaginitis of mixed bacterial and viral etiology.

УДК 577.1

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МАРКЕРА С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В КАЧЕСТВЕ МЕТКИ

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

Разработана иммунохроматографическая тест-система для определения С-реактивного белка с применением квантовых точек в качестве меток. Показано, что обеспечиваемый с ее помощью предел детекции – 0,1 нг/мл – на три порядка ниже по сравнению с коммерческими тест-системами. Рассмотрены возможности применения тест-систем для индивидуальной оценки эффективности антибиотикотерапии.

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ, С-реактивный белок, иммуноанализ, квантовые точки

Реализация персонализированной медицины обеспечивает максимально эффективную диагностику и терапию заболеваний, в том числе бактериальной природы. Эффективность лечения зависит от правильной и своевременной лабораторной диагностики, включающей контроль уровня воспалительных маркеров в крови человека. Иммунохроматографические методы – наиболее перспективное средство для такого мониторинга благодаря экспрессности анализа, простоте его проведения и оценки результатов.

Представлены результаты разработки иммунохроматографической методики определения биомарке-

ра воспалительных процессов – С-реактивного белка – в сыворотке крови. Отличительной особенностью является использование в качестве метки квантовых точек вместо традиционного маркера – золотых наночастиц. Предел обнаружения С-реактивного белка составил 0,1 нг/мл, что на три порядка ниже, чем у коммерческих тест-систем. Высокочувствительный мониторинг уровня воспалительного маркера позволит делать аргументированные заключения об эффективности антибиотикотерапии инфекций бактериальной этиологии.

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

DEVELOPMENT OF A HIGH-SENSITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM FOR DETERMINATION OF THE INFLAMMATORY MARKER C-REACTIVE PROTEIN USING QUANTUM DOTS AS A LABEL

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*

An immunochromatographic test system for determining the C-reactive protein using quantum dots as labels has been developed. It is shown that the detection limit is 0.1 ng/ml - is three orders of magnitude lower compared to commercial test systems. The possibilities of using test systems for individual evaluation of the effectiveness of antibiotic therapy are considered.

Key words: immunochromatographic analysis, C-reactive protein, immunoassay, quantum dots

The implementation of personalized medicine provides the most efficient diagnosis and therapy of diseases, including those of a bacterial nature. The effectiveness of treatment depends on the correct and timely laboratory diagnosis, including monitoring the level of inflammatory markers in human blood. Immunochromatographic methods are the most promising means for such monitoring due to express analysis, simplicity of its analysis and evaluation of results.

The results of the development of immunochromatographic methods for determining the biomarker of inflammatory processes - C-reactive protein - in blood serum are presented. A distinctive feature is the use as a label of quantum dots instead of the traditional marker - gold nanoparticles. The detection limit of C-reactive protein was 0.1 ng/ml, which is three orders of magnitude lower than that of commercial test systems. Highly sensitive monitoring of the level of the inflammatory marker allows to make reasoned conclusions about the effectiveness of antibiotic therapy for infections of bacterial etiology.

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 615.371:616-022.7

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Михайлова Н.А., Зими́на Е.М., Лазарев С.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
e-mail: n_michailova@inbox.ru*

По данным ВОЗ синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) входит в список 12 бактерий, которые представляют наибольшую опасность для здоровья человека. Профилактика инфекций, вызванных си-

негнойной палочкой, представляет сложность ввиду устойчивости возбудителя ко многим антибиотикам, в том числе карбапенемам и цефалоспорином.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, иммунопрофилактика, синегнойная инфекция

Одним из основных возбудителей гнойно-септических заболеваний является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), которую в классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) по приоритетности относят к критически высокому уровню.

Неприхотливость микроорганизма к условиям внешней среды и его высокой резистентности к большинству антибиотиков и химиотерапевтических средств обеспечило данной инфекции широкое распространение. Резистентность синегнойной палочки обоснована наличием ряда механизмов устойчивости, включая ферментативную модификацию лекарств. Благоприятные условия для развития инфекционного процесса создаются при нарушении целостности кожного покрова и слизистых оболочек и ослаблении иммунитета. Наиболее часто этот микроорганизм является причиной серьезных патологий у лиц с нарушением иммунного статуса, в том числе у больных муковисцидозом – генетическом заболевании, сопровождающимся увеличением и сгущением секрета, способствующего колонизации легких.

Одним из приоритетных подходов для борьбы с синегнойной инфекцией является иммунопрофилактика. В России и за рубежом для индукции иммунитета против *P. aeruginosa* разрабатываются вакцинные препараты на основе живых аттенуированных штаммов, убитых цельных клеток и компонентов разрушенных клеток. Однако, подобные препараты в большинстве токсичны, а получение высокоочищенных протективных безопасных антигенов традиционными методами представляет собой дорогостоящий и трудоемкий процесс. Развитие молекулярно-генетических технологий открыло перспективу создания вакцин против синегнойной инфекции на основе рекомбинантных белков.

Показана принципиальная возможность использования в качестве основы вакцин рекомбинантных белков наружной мембраны (OprF, OprL и OprI), рекомбинантных анатоксинов, рекомбинантных белков пилей и жгутиков. Молекулярно-генетические технологии позволяют получать отдельные рекомбинантные белки, а также создавать слитые «гибридные» формы. Таким образом в создании рекомбинантных вакцин можно выделить два направления: 1) на основе комплексов отдельных белков и 2) создание слитых многокомпонентных гибридов.

В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова проводятся исследования по разработке вакцины на основе комплекса двух рекомбинантных белков: наружной мембраны (OprF) и анатоксина, которая находится в стадии доклинических исследований. Кроме того, получен ряд гибридных белков, изучение иммунологических свойств которых позволит рассматривать их в качестве перспективных для создания противосинегной вакцины нового поколения.

UDC 615.371:616-022.7

MODERN DIRECTIONS OF IMMUNOPROPHYLACTIC SYNEGIC INFECTION

Michailova N.A., Zimina E.M., Lazarev S.A.

The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow
 e-mail: n_michailova@inbox.ru

According to the WHO, *Pseudomonas aeruginosa* is included in the list of 12 bacteria which pose the greatest danger to human health. Prophylaxis of infections caused by the *Pseudomonas aeruginosa* is a problem because of its resistance to many antibiotics, including carbapenems and cephalosporins.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, immunoprophylaxis, *Pseudomonas* infection.

One of the main causative agents of purulent-septic diseases is *Pseudomonas aeruginosa*, which has a critically high level of priority in World Health Organization (WHO) classification.

The unpretentiousness of the microorganism to the environmental conditions and its high resistance to most of antibiotics and chemotherapeutic agents provided widespread distribution of this infection. *Pseudomonas aeruginosa*'s resistance is justified by the presence of a number of resistance mechanisms, including enzymatic modification of drugs. Enabling environment for the development of the infection process are created by integrity violation of skin and mucous membranes and weakening of the immune system. The most frequently this microorganism is cause of the serious pathologies of persons with impaired immune status, including patients

with cystic fibrosis - genetic disease, accompanied by increase and thickening of secret, contributing to lungs colonization.

One of the priority approaches to combat pseudomonas infection is immunoprophylaxis. The vaccine preparations for induction the immunity against *P. aeruginosa* based on alive attenuated strains, killed whole cells and components of destroyed cells are created in Russia and abroad. However, the similar drugs are mostly toxic, and production of highly purified protective safe antigens by traditional methods is expensive and time-consuming process. Development of the molecular-genetic technologies opened the prospect for creating vaccines against pseudomonas infection based on recombinant proteins.

There was presented the principal possibility of using recombinant outer membrane proteins (OprF, OprL и OprI), recombinant toxoids, recombinant pili and flagella proteins as base of the vaccine. Molecular-genetic technologies allow obtaining of the individual recombinant proteins and creating of the fusion «hybrid» forms. So, there can be distinguished two directions in the creation of recombinant vaccines: 1) based on complexes of individual proteins and 2) creation fusion multicomponent hybrids.

In Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera research on development vaccine based on complex of two recombinant proteins: outer membrane (OprF) and toxoid, which is in preclinical studies, is being conducted. In addition, there was obtained a number of hybrid proteins, study of immunobiological properties of which will allow them to be consider as promising for creation new-generation anti- pseudomonas vaccine.

СОВРЕМЕННЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА МЕТОДОМ CRISPR-CAS9

Новожилова Н.М.

Thermo Fisher Scientific
117685, г. Москва, Россия, Обручева 30/1, стр 2
e-mail: natalia.novozhilova@thermofisher.com

Бурное развитие различных методов редактирования генома играет значительную роль в современной науке и открывает широкие возможности, как для фундаментальных исследований, так и для прикладных областей биотехнологии, медицины и сельского хозяйства.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR-Cas9, геномная инженерия

Одним из методов редактирования является использование инструментов системы адаптивного иммунного ответа прокариот CRISPR-Cas9 для внесения двухцепочечного разрыва в целевой локус геномной ДНК, который, впоследствии, репарируется естественными механизмами репарации клетки. Система CRISPR-Cas9 получила широкое применение во всем мире благодаря простому и быстрому протоколу и широким возможностям практического применения.

Для ученых, использующих эту систему очень важно получить максимально точный разрыв в целевом локусе и свести к минимуму побочные эффекты.

Для этого мы разработали полное решение для редактирования генома методом CRISPR-Cas9. Методология включает в себя: дизайн эксперимента, выбор оптимальных локусов для редактирования, анализ сайтов неспецифического связывания, выбор оптимального формата редактирования, введение инструментов редактирования в клетку и анализ полученных изменений.

Благодаря использованию данной методики возможно достижение высокой точности редактирования даже в клетках трудно поддающихся генно-инженерным манипуляциям, таким как первичные клеточные культуры, клетки иммунной системы и стволовые. На примере Т-клеток мы смогли осуществить и показали нокаут рецепторов TRAC и TRBC более чем на 90%.

Таким образом наше полное решение для для редактирования генома методом CRISPR-Cas9 позволяет максимально эффективно осуществлять редактирование генома у широкого спектра клеток, включая первичные, иммунные и стволовые клетки.

NEW WORKFLOW TOOLS FOR CRISPR-CAS9 GENOME EDITING

Novozhilova N.M.

*Thermo Fisher Scientific
117685, Moscow, Russia, Obrucheva str 30/1, bld 2
e-mail: natalia.novozhilova@thermofisher.com*

The powerful gene editing technology has the potential to transform modern science at an astonishing rate and opens broad possibilities for fundamental research, as well as applied areas such as biotechnology, medicine and agriculture.

Key words: genome editing, CRISPR-Cas9, genome engineering

One of the editing methods is based on a prokaryotic adaptive immune system CRISPR-Cas9 that uses an RNA-guided DNA nuclease to break double-strand DNA at desired location. After that the break is repaired by the natural repair mechanisms of the cell, creating knock outs, inserts or deletions. CRISPR/Cas9 technology has currently revolutionized biological research worldwide because of the ease of design, simple editing workflow and broad host application. For scientists working with genome editing it is the most important to maximize the break in target loci while minimizing side effects and non-target breaks. To help to achieve this we developed a complete solution for CRISPR-CAS9 genome editing. Complete solution includes experimental design, choosing the optimal loci for editing, analysis of non-specific binding, selecting the optimal CRISPR-CAS9 formats, delivery conditions and detection of editing results.

High editing efficiency is especially important when working with difficult-to-edit and valuable cells such as primary cells, immune cells, and stem cells. By using our high-quality and efficient CRISPR-Cas9 system we were able to demonstrate over 90% functional knockout of the T cell receptor TRAC and TRBC in donor-derived primary T cell populations.

Thus, our complete genome editing CRISPR-Cas9 system allows high genomic DNA cleavage efficiency and functional knockout in a broad range of cells, including primary, immune and stem cells.

УДК: 578.74, ББК: 28.3

СОЗДАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ АНТИГЕННОЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ ДЛЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ

Т.И.Манухова¹, Е.А.Евтушенко¹, Н.А.Никитин¹, О.В.Карпова¹

*¹Кафедра вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119192, Москва, Ленинские Горы, 1-12,
e-mail: tanyafedorova0411@gmail.com*

Настоящая работа посвящена созданию рекомбинатного антигена на основе M2e-эпитопа вируса гриппа А. Предлагаемая разработка является перспективным компонентом универсальной маркерной ветеринарной вакцины против гриппа птиц.

Ключевые слова: ветеринарные вакцины, вирусы растений, вирус гриппа птиц, рекомбинатный антиген, M2e-эпитоп

Птичий грипп – инфекционное заболевание птиц, возбудителем которого является вирус гриппа А. Помимо значительного экономического ущерба для агропромышленного комплекса вирус гриппа А птиц представляет риск и для человека. Известны спорадические случаи заражения людей штаммом вируса птиц H5N1, имеющие зоонозную природу [1].

Настоящая работа посвящена созданию универсальной антигенной детерминанты против вируса гриппа птиц. Основой для разработки является эпитоп M2e (эктодомен ионного канала M2). В отличие от антигенных детерминант гемагглютинаина и нейраминидазы домен M2e является консервативным пептидом для большого количества штаммов вируса гриппа А [2], и, следовательно, может быть использован в качестве универсальной антигенной детерминанты при создании вакцины против гриппа.

Для создания рекомбинатного белка мы выбрали консервативную последовательность пептида M2e

для подтипа вируса гриппа птиц подтипа H5. Помимо указанного пептида мы использовали дополнительную последовательность M2e, консенсусную для штаммов H1N1, H2N2, H3N2. Нами была получена генетическая конструкция, несущая в своем составе нуклеотидную последовательность, в которой были закодированы 6 повторов эпитопа M2e. Рекомбинантный белок с молекулярной массой около 24 кДа был экспрессирован в бактериальных клетках и очищен. Согласно данным, опубликованным ранее нашей лабораторией [3], такой размер белка является оптимальным для создания иммунологических комплексов со структурно модифицированными вирусами растений/вирусоподобными частицами, которые в вакцинном препарате могут выступать в качестве эффективного адъюванта. Использование адъювантов на основе вирусов растений позволит создать отечественную маркерную ветеринарную вакцину, поскольку при вакцинации часть антител будет вырабатываться на адъювант, что позволит удостовериться в том, что животное было провакцинировано, а не проконтактировало с полевым вирусом. Иммунохимический анализ показал, что рекомбинантный белок является антигенно-специфичным и обладает иммунологическим потенциалом для создания вакцинных препаратов против вируса гриппа птиц. Присутствие в составе рекомбинантного антигена эпитопа с консенсусной последовательностью для штаммов H1N1, H2N2, H3N2 также может позволить рассматривать этот антиген как компонент вакцины для человека, способной защищать как от сезонной гриппозной инфекции, так и от высоко контагиозных штаммов вируса гриппа птиц подтипа H5.

Литература:

1. Krammer F., Gavin J. D., Smith R. A., Fouchier M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M., Treanor J., Webster R.G., García-Sastre A. Influenza // *Nature Reviews Disease Primers*. 2018. V. 4. Article number 3
2. Kolpe A., Schepens B., Fiers W., Saelens X. M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential // *Expert Review of Vaccines*. 2017. V. 16. №2. P. 123-136.
3. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyayev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antiviral research*. 2017. V. 144. P. 27-33.

UDC: 578.74

THE DEVELOPMENT OF VERSATILE ANTIGENIC DETERMINANT FOR THE AVIAN INFLUENZA VIRUS VACCINE

T.Manukhova¹, E.Evtushenko¹, N.Nikitin¹, O.Karpova¹

¹Department of virology, faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Russian Federation, 119192, Moscow, Leninskie Gory, 1-12
e-mail: tanyafedorova0411@gmail.com

The present work is aimed to the development of recombinant antigen based on influenza A virus M2e-epitope. The proposed elaboration can be the perspective component of universal marker veterinary vaccine against avian influenza.

Key words: veterinary vaccines, plant viruses, avian influenza virus, recombinant antigen M2e-epitope

Influenza is infectious respiratory disease of birds. In most cases, it caused by influenza A virus (IAV). In addition to economic loss for agriculture, avian IAV is dangerous for human. Sporadic cases of human infection from birds by H5N1 avian IAV strain were reported [1].

The present work is devoted to the development of versatile avian influenza virus antigenic determinant. The elaboration is based on M2e-epitope (ectodomain of ionic channel M2). In contrast to neuraminidase and hemagglutinin M2e is highly conserved [2] for large number of IAV strains. Hence, M2e peptide can be very useful for versatile antigen determinant design.

For recombinant antigen development we have chosen the conserved M2e sequence for avian IAV, subtype H5. Furthermore, we have used the additional M2e consensus for human pathogenic H1N1, H2N2, H3N2 strains. We have designed the genetic construction with the 6 repeats of M2e-sequence. The recombinant protein was expressed in bacteria cells and purified. We have obtained the recombinant antigen (molecular weight 24 kDa). According to the previous results, published by our laboratory [3], this protein size is suitable for immunogenic complexes formation with structurally modified plant viruses or virus-like particles (VLPs) as the effective adjuvant. The immunogenic mixture with modified plant viruses and VLPs allows to develop the first Russian veterinary marker vaccine. The antibody spectrum after immunization by the proposed vaccine will include the antibodies

against adjuvant. Consequently, it will be possible to identify how an animal were immunized – by contact with wild pathogen or by vaccination. According to the immunochemistry analysis, recombinant protein have the specific immunogenic potential in using for vaccine against avian influenza. The presence of M2e consensus sequence for H1N1, H2N2, H3N2 strains in the recombinant protein permits to use the obtained antigen as the component for human vaccine. This vaccine will have the ability to protect not only from seasonal influenza infection, but also from high-contagious avian H5 HAV strain.

References:

1. Krammer F., Gavin J. D., Smith R. A., Fouchier M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M., Treanor J., Webster R.G., García-Sastre A. Influenza // *Nature Reviews Disease Primers*. 2018. V. 4. Article number 3
2. Kolpe A., Schepens B., Fiers W., Saelens X. M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential // *Expert Review of Vaccines*. 2017. V. 16. №2. P. 123-136.
3. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antiviral research*. 2017. V. 144. P. 27-33.

УДК 578.832

СТИМУЛЯЦИЯ ОБЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА КОМПЛЕКСНЫМ РАСТИТЕЛЬНЫМ ПРЕПАРАТОМ

Турмагамбетова А.С., Алексюк М.С., Богоявленский А.П., Алексюк П.Г., Омиртаева Э.С., Березин В.Э.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан
 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105
 e-mail: aichyck@mail.ru

В результате проведенных исследований показано, что активацию генов общего неспецифического иммунного ответа можно значительно повысить путем введения в организм неспецифических иммуностимуляторов растительного происхождения, содержащих тритерпен с гликозилированным метоксифлавоноидом.

Ключевые слова: растение, иммуностимулятор, экспрессия генов, метоксифлавоноид

В последнее время большое внимание исследователей в различных отраслях знаний уделяется оценкам новых возможностей, возникающих в связи с бурным развитием биохимии, фармакологии и иммунологии. Ряд исследований, проведенных с биологически активными веществами показал, что определенные группы соединений способны стимулировать разные звенья иммунитета. В настоящее время проводится интенсивное изучение механизмов активации врожденного и специфического противовирусного иммунитета и поиск новых иммуностимуляторов, способных повысить активность иммунного ответа [1, 2].

Целью исследований являлось изучение стимуляции неспецифического противовирусного иммунитета биологически активными соединениями растительного происхождения для разработки новых лекарственных средств, способных повышать резистентность организма к вирусным инфекциям.

Проведено изучение стимуляции общего противовирусного иммунитета комбинациями бетулина с гликозилированными метоксифлавоноидными препаратами растительного происхождения (гликозидом изорамнетины и гесперидином).

Изучение экспрессии генов IL-6 и TNF проведено при однократном введении экспериментальным животным комбинаций указанных иммуностимулирующих препаратов. Через 3 дня у животных собирали макрофаги и определяли в них уровень экспрессии генов выбранных цитокинов. Установлено, что уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина IL-6 по сравнению с контрольной группой повышался на $13,7 \text{ Log}_2$ в случае использования в качестве иммуностимулятора смеси бетулин - гликозид изорамнетины и на $5,8 \text{ Log}_2$ при введении животным бетулина в сочетании с гесперидином.

На примере изучения изменения уровня экспрессии гена TNF показано, что после запуска воспалительного процесса происходила активация следующей фазы иммунного ответа – врожденного иммунитета при введении указанных препаратов. Установлено, что уровень экспрессии данного гена увеличивался на $2,8 \text{ Log}_2$ при введении гесперидина с бетулином. Комплексный препарат бетулина с гликозидом изорамнетины подавлял уровень экспрессии гена TNF по сравнению с контролем на $0,3 \text{ Log}_2$ при иммунизации экспериментальных животных.

Показано, что комплексный препарат бетулина с гликозидом изорамнетина вызывал настолько сильную секрецию IL-6, что произошло подавление секреции гена TNF.

Таким образом, установлено, что активность общего неспецифического иммунного ответа, в частности активацию генов провоспалительных цитокинов, можно значительно повысить путем введения в организм неспецифических иммуностимуляторов растительного происхождения, содержащих тритерпен с гликозилированным метоксифлавоноидом.

Исследование выполнено за счет гранта AP05130957 Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература:

1 Son Y.O., Kook S.H., Lee J.C. Glycoproteins and Polysaccharides are the Main Class of Active Constituents Required for Lymphocyte Stimulation and Antigen-Specific Immune Response Induction by Traditional Medicinal Herbal Plants// *Journal of Medicinal Food*. 2017. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3943>.

2 Wei W., Feng L., Bao W.R. et al. Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium officinale*// *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016. V. 64. P. 881–889.

UDC 578.832

STIMULATION OF GENERAL ANTI-VIRAL IMMUNITY OF COMPLEX PLANT PREPARATION

Turmagambetova A.S., Alexyuk M.S., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk P.G., Omirtaeva E.S., Berezin V.E.

*Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, 105, Bogenbai Batyr Street
e-mail: aichyck@mail.ru*

As a result of the research it was shown that the activation of genes of a general non-specific immune response can be significantly increased by introducing into the body non-specific plant-derived immunostimulants containing triterpene with glycosylated methoxyflavonoid.

Key words: plant, immunostimulant, gene expression, methoxyflavonoid

Recently much attention of researchers in various branches of knowledge has been paid to evaluations of new opportunities arising from the rapid development of biochemistry, pharmacology and immunology. A number of studies carried out with biologically active substances showed that certain groups of compounds are able to stimulate different parts of the immune system. Currently, an intensive study of the mechanisms of activation of innate and specific antiviral immunity and the search for new immunostimulants capable of increasing the activity of the immune response are underway [1, 2].

The aim of the research was to study the stimulation of non-specific antiviral immunity by biologically active compounds of plant origin for the development of new medicines that can increase the body's resistance to viral infections.

A study of the stimulation of general antiviral immunity was carried out by combinations of betulin with glycosylated methoxyflavonoid preparations of plant origin (isorhamnetin glycoside and hesperidin).

The study of the expression of IL-6 and TNF genes was carried out at a single administration of the indicated immunostimulant preparations into experimental animals. After 3 days macrophages were collected from animals and the level of gene expression of selected cytokines was determined. It was determined that the expression level of the pro-inflammatory cytokine IL-6 gene increased by 13.7 Log₂ at the administration of betulin - glycoside of isorhamnetin composition compared to the control group and by 5.8 Log₂ when animals was administered by complex preparation betulin - hesperidin.

After the starting of the inflammatory process was activated the next phase of the immune response – innate immunity by the administration of investigated preparations as the example of studying the changes in the expression level of the TNF gene. It was determined that the expression level of this gene increased by 2.8 Log₂ by the administration of hesperidin with betulin. The complex preparation of betulin with isorhamnetin glycoside suppressed the expression level of the TNF gene compared to the control by 0.3 Log₂ upon immunization of experimental animals.

It was shown that the complex preparation of betulin with isorhamnetin glycoside caused such strong secretion of IL-6 that the secretion of the TNF gene was suppressed.

Thus, it has been determined that the activity of a general non-specific immune response in particular the activation of pro-inflammatory cytokine genes can be significantly increased by administration the non-specific plant-derived immunostimulants containing triterpene with glycosylated methoxyflavonoid.

This work was supported by grant AP05130957 from the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 Son Y.O., Kook S.H., Lee J.C. Glycoproteins and Polysaccharides are the Main Class of Active Constituents Required for Lymphocyte Stimulation and Antigen-Specific Immune Response Induction by Traditional Medicinal Herbal Plants// *Journal of Medicinal Food*. 2017. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3943>.
- 2 Wei W., Feng L., Bao W.R. et al. Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium officinale*// *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016. V. 64. P. 881–889.

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПУТЕМ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНИ ТИМУСА В ПЕРЕДНЮЮ КАМЕРУ ГЛАЗА

Глазкова П.А.

ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Россия, 129110, Москва, Москва, улица Щепкина 61/2, ,
 e-mail: polinikul@mail.ru

Разработана уникальная методика трансплантации ткани тимуса в переднюю камеру глаза крыс. Предложенная методика приводит к замедлению скорости инволюции тимуса реципиента, а также к увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных. Геропротекторная эффективность трансплантации ткани тимуса в переднюю камеру глаза зависит от возраста животных-реципиентов.

Ключевые слова: тимус, продолжительность жизни, трансплантация, передняя камера глаза

Тимус (вилочковая железа) – центральный орган иммунной системы, место созревания, дифференцировки и «обучения» Т-лимфоцитов [1]. У всех незимоспящих млекопитающих тимус подвержен выраженной возрастной инволюции [2]. Известно, что возрастная инволюция тимуса играет существенную роль в дисфункциях иммунной системы и ассоциирована с увеличением частоты онкологических, инфекционных и других заболеваний [3, 4, 5]. В литературе можно встретить точку зрения, рассматривающую инволюцию тимуса как важный фактор, управляющий старением и влияющий на продолжительность жизни [6, 7]. Таким образом, можно предположить, что разработка способов замедления возрастных морфо-функциональных изменений тимуса может помочь в решении задач продления жизни и коррекции иммунодефицитных состояний.

Нами была выдвинута гипотеза о возможности коррекции процесса инволюции тимуса путем пересадки аллогенной ткани тимуса в переднюю камеру глаза (ПКГ). Выбор места трансплантации основан на иммунологической привилегированности ПКГ [8]. Такая локализация трансплантата позволяет отказаться от применения иммуносупрессивных препаратов.

Исследование велось на крысах Wistar (n=87). В первую серию работ были включены 45 животных в возрасте 3,5 месяца. Экспериментальной группе (n=21) выполнили пересадку аллогенной ткани тимуса в ПКГ. Группа интактного контроля состояла из 24 животных. Во вторую серию работ были включены 42 крысы в возрасте 17 месяцев. Половине животных (n=21) была проведена трансплантация аллогенной ткани тимуса, половина (n=21) – вошла в группу интактного контроля. Все животные были оставлены на выживание в стандартных условиях вивария с ежедневным контролем. На основании продолжительностей жизни животных в обеих группах были построены кривые кумулятивной выживаемости Каплана-Майера.

Нами было показано отсутствие значимого увеличения кумулятивной выживаемости после трансплантации ткани тимуса в ПКГ 3,5-месячным животным (p=0,171, критерий Кокса). В эксперименте с «пожилыми» животными нами было показано статистически значимое увеличение кумулятивной выживаемости после трансплантации ткани тимуса в ПКГ (p<0,01, критерий Кокса). В экспериментальной группе животных наблюдалось увеличение медианы выживаемости на 19,5%, минимальной продолжительности жизни на 26%, максимальной продолжительности жизни на 32% и средней продолжительности жизни на

26%. Также было показано, что трансплантация тимуса приводит к увеличению количества тимоцитов в собственном тимусе реципиента.

Хорошие результаты трансплантации тимуса пожилым реципиентам контрастировали с низкой эффективностью манипуляции на молодых крысах. Вероятно, эта особенность может быть объяснена регулирующим воздействием организма реципиента на трансплантат.

Показано, что трансплантация ткани тимуса в переднюю камеру глаза может увеличивать продолжительность жизни экспериментальных животных. Трансплантация, осуществленная молодым животным, не приводит к увеличению кумулятивной выживаемости. Трансплантация, осуществленная «пожилым» животным, приводит к увеличению кумулятивной выживаемости, медианы выживаемости на 19,5%, минимальной продолжительности жизни на 26%, максимальной продолжительности жизни на 32% и средней продолжительности жизни на 26%.

Финансирование: программа «УМНИК» («Участник молодежного научно-инновационного конкурса»).

Литература:

1. Boehm T. Thymus development and function // *Current opinion in immunology*. – 2008. – Vol.20, №.2. – P.178-184.
2. Gui J. [et al.] Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma // *Aging and disease*. – 2012. – Vol.3, №. 3. – P.280-290.
3. Foster A. D., Sivarapatna A., Gress R. E. The aging immune system and its relationship with cancer // *Aging health*. – 2011. – Vol.7, №. 5. – P.707-718.
4. Ventevogel M. S., Sempowski G. D. Thymic rejuvenation and aging // *Current opinion in immunology*. – 2013. – Vol.25, №.4. – P.516-522.
5. Yager E. J. [et al.] Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus // *The Journal of experimental medicine*. – 2008. – Vol.205, №.3. – P.711-723.
6. Csaba G. The Immunoendocrine Thymus as a Pacemaker of Lifespan // *Acta Microbiol. Immunol. Hungarica*. 2016. Vol. 63. № 2. P. 139–158.
7. Csaba G. The role of the pineal-thymus system in the regulation of autoimmunity, aging and lifespan // *Orvosi hetilap*. 2016. Vol. 157. № 27. P. 1065.
8. Barker C. F., Billingham R. E. Immunologically privileged sites // *Advances in immunology*. – 1978. – Vol.25. – P.1-54.

INCREASED LONGEVITY OF EXPERIMENTAL ANIMALS BY TRANSPLANTING THYMUS TISSUE INTO THE ANTERIOR CHAMBER OF THE EYE.

Glazkova P.A.

Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI")
e-mail: polinikul@mail.ru

A unique method of thymus tissue transplantation into the anterior chamber of the eye has been developed. The proposed technique leads to a slowdown in the rate of involution of the thymus of the recipient, as well as to an increase in the life span of experimental animals. Geroprotective effectiveness of thymus tissue transplantation into the anterior chamber of the eye depends on the age of the recipient animals.

Key words: thymus, lifespan, transplantation, anterior chamber

The thymus is the central organ of the immune system, the place of maturation, differentiation and "training" of T-lymphocytes [1]. A pronounced age-related involution occurs in the thymus [2]. It is known that age-related involution of the thymus plays a significant role in the dysfunctions of the immune system and is associated with an increase in the incidence of cancer, infectious diseases, and other diseases [3, 4, 5]. In addition, some authors believe that a decrease in the functional activity of the thymus may affect longevity [6, 7]. Thus, it can be assumed that the development of methods for slowing down the age-related morphological and functional changes in the thymus can help in solving the problems of prolonging life and correcting immunodeficiency states.

We proposed a hypothesis about the possibility of correcting the process of involution of the thymus by transplanting allogeneic tissue of the thymus into the anterior chamber of the eye (ACE). The choice of the site of transplantation is based on the immunological privilege of the ACE [8]. Such localization of the graft allows to refuse the use of immunosuppressive drugs.

The study was conducted on Wistar rats (n = 87). The first series of works included 45 animals at the age of 3.5 months. The experimental group (n = 21) underwent transplantation of allogeneic thymus tissue in the ACY. The intact control group consisted of 24 animals. The second series of studies included 42 rats aged 17 months. Half

of the animals ($n = 21$) underwent allogeneic thymus tissue transplantation, half ($n = 21$) - were included into the intact control group. All animals were left to survive in standard vivarium conditions with daily monitoring. Based on the life expectancy of the animals in both groups, Kaplan-Meier cumulative survival curves were constructed.

We have shown the absence of a significant increase in cumulative survival after transplantation of thymus tissue in the ACY of 3.5-month-old animals ($p = 0.171$, Cox test). In the experiment with "elderly" rats, we showed a statistically significant increase in cumulative survival after transplantation of thymus tissue in the ACY ($p < 0.01$, Cox test). In the experimental group of animals, there was an increase in the median survival by 19.5%, the minimum life expectancy by 26%, the maximum life expectancy by 32% and the average life expectancy by 26%. It has also been shown that thymus transplantation leads to an increase in the number of thymocytes in the recipient's own thymus.

The good results of thymus transplantation in elderly recipients contrasted with the low efficiency of manipulation in young rats. Probably, this can be explained by the regulatory influence of the recipient on the graft.

It has been shown that transplantation of thymus tissue into the anterior chamber of the eye may increase the lifespan of experimental animals. Transplantation performed on young animals does not lead to an increase in cumulative survival. Transplantation performed on "older" animals leads to an increase in cumulative survival, median survival by 19.5%, minimum life expectancy by 26%, maximum life expectancy by 32% and average life expectancy by 26%.

Grant: the program "UMNIK"

References:

1. Boehm T. Thymus development and function // *Current opinion in immunology*. – 2008. – Vol.20, №.2. – P.178-184.
2. Gui J. [et al.] Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma // *Aging and disease*. – 2012. – Vol.3, №. 3. – P.280-290.
3. Foster A. D., Sivarapatna A., Gress R. E. The aging immune system and its relationship with cancer // *Aging health*. – 2011. – Vol.7, №. 5. – P.707-718.
4. Ventevogel M. S., Sempowski G. D. Thymic rejuvenation and aging // *Current opinion in immunology*. – 2013. – Vol.25, №.4. – P.516-522.
5. Yager E. J. [et al.] Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus // *The Journal of experimental medicine*. – 2008. – Vol.205, №.3. – P.711-723.
6. Csaba G. The Immunoendocrine Thymus as a Pacemaker of Lifespan // *Acta Microbiol. Immunol. Hungarica*. 2016. Vol. 63. № 2. P. 139–158.
7. Csaba G. The role of the pineal-thymus system in the regulation of autoimmunity, aging and lifespan // *Orvosi hetilap*. 2016. Vol. 157. № 27. P. 1065.
8. Barker C. F., Billingham R. E. Immunologically privileged sites // *Advances in immunology*. – 1978. – Vol.25. – P.1-54.

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

NANOBIOTECHNOLOGIES IN MEDICINE

1. АКТИВНОСТЬ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИЗОСТАФИНА С АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ, Шестак Н.В., Гришин А.В., Ляшук А.М., Лаврова Н.В., Струкова Н.В., Генералова М.С., Рязанова А.В., Карягина А.С., Лунин В.Г.	197
ACTIVITY AND PHARMACOKINETICS OF LYSOSTAPHIN WITH ALBUMIN-BINDING DOMAIN, Shestak N.V., Grishin A.V., Lyashchuk A.M., Lavrova N.V., Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V., Karyagina A.S., Lunin V.G.	198
2. АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАНОЭМУЛЬСИЙ А-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ, В.А.Щелконогов, А.В.Шипелова, А.М.Синебрюхова, Е.С.Дарнотук, Н.С.Шастина, В.А.Щелконогов, К.С.Жигалова, О.А.Баранова, А.В.Чеканов, К.Д.Казаринов, Э.Ю.Соловьева, А.И.Федин	199
ANTIPLATELET EFFICIENCY OF NANOEMULSIONS OF A-LIPOIC ACID, V.Shchelkonogov, A.Shipelova, A.Sinebryukhova, E.Darnotuk, N.Shastina, V.Shchelkonogov, K.Zhigalova, O.Baranova, A.Chekanov, K.Kazarinov, E.Solovyova, A.Fedin	200
3. БИОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА МЕТИЛОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ METHYLOPHILUS QUAYLEI И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА, Мохамед А.М.Х.А., Сорокин В.В., Складнев Д.А., Пшеничникова А.Б.	202
BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES BY METHYLOPHILUS QUAYLEI, THEIR ANTIBIOFILM ACTIVITIES, AND CHARACTERIZATIONS, Mohamed A. M. H. A., Sorokin V.V., Skladnev D.A., Pshenichnikova A.B.	203
4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОСОМ, НАГРУЖЕННЫХ ЛИПОФИЛЬНЫМ ПРОЛЕКАРСТВОМ МЕЛФАЛАНА, С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ, Д.С.Третьякова, И.М.Ле-Дейген, Е.В.Кудряшова, Е.Л.Водовозова	204
INTERACTIONS OF LIPOSOMES LOADED WITH MELPHALAN LIPOPHILIC PRODRUG IN THE BILAYER WITH SERUM ALBUMIN: FTIR-SPECTROSCOPY RESEARCH, D.Tretiakova, I.Le-Deygen, E.Kudryashova, E.Vodovozova	205
5. ВЛИЯНИЕ АСТРОЦИТАРНЫХ АНТИГЕНОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, Чехонин И.В., Чернышева А.А., Фомина У.Н., Черепанов С.А., Кардашова К.Ш., Гурина О.И.	206
THE INFLUENCE OF ASTROCYTIC ANTIGENS ON DENDRITIC CELL IMMUNOGENICITY, I.V. Chekhonin, A.A. Chernysheva, U.N. Fominova, S.A. Cherepanov, K.Sh. Kardashova, O.I. Gurina	207
6. ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОМЕМБРАН В КОМПЛЕКСЕ С МАГНИТНЫМИ НАНОСТЕРЖНЯМИ, Куценко Е.О., Ле-Дейген И.М., Усвалиев А.Д., Ханей М.Д., Батракова Е.В., Кabanov A.V., Головин Ю.И., Клячко Н.Л.	208
INFLUENCE OF MAGNETIC FIELD PARAMETERS ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF BIOMEMBRANES IN THE COMPLEXES WITH MAGNETIC NANORODS, Kutsenok E.O., Le-Deygen I.M., Usvaliev A.D., Haney M.J., Batrakova E.V., Kabanov A.V., Golovin Yu.I., Klyachko N.L.	209
7. ВЛИЯНИЕ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНОВОГО ОТВЕТА КЛЕТОК НА ОНКОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА, Сосновцева А.О., Липатова А.В., Чумаков П.М., Чехонин В.П.	210
INFLUENCE OF THE CELLS INTERFERON RESPONSE SYSTEM ON THE ONCOLYTIC ACTIVITY OF NON-PATHOGENIC HUMAN ENTEROVIRUSES, Sosnovtseva A.O., Lipatova A.V., Chumakov P.M., Chekhonin V.P.	211
8. ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО УЛЬТРАЗВУКОВОГО СТРЕССА В ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ПОТОМСТВА КРЫС, Абрамова О.В., Зубков Е.А., Зоркина Я.А., Морозова А.Ю.	212
EFFECT OF THE PRENATAL CHRONIC ULTRASONIC STRESS ON COGNITION IN RAT OFFSPRING, Abramova O.V., Zubkov E.A., Zorkina Ya.A., Morozova A.Yu.	213
9. ДИЗАЙН НАНОЧАСТИЦ ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В-ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ФТОРХИНОЛОНОВ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ, А.А.Скuredина, Е.В.Кудряшова.	214
THE DESIGN OF OLIGOMERIC NANOPARTICLES BASED ON B-CYCLODEXTRIN DERIVATIVES TO CREATE THE DELIEVERY SYSTEM WITH PROLONGED RELEASE FOR FLUOROQUINOLONE, A.Skuredina, E.Kudryashova.....	216
10. ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ, Макаров М.С.	217
HIGH CONCENTRATION OF ASCORBIC ACID CHANGES HUMAN PLATELETS' MORPHOFUNCTIONAL RATE, Makarov M.S.	218

11. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МАННОЗО-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИСАХАРИДОВ С КОНКАНАВАЛИНОМ А МЕТОДОМ ATR-FTIR СПЕКТРОСКОПИИ, Мамаева П.В., Ле-Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В.	218
THE PROCESS OF COMPLEX FORMATION OF MANNOSE-CONTAINING POLYSACCHARIDES WITH CONCANAVALINE A AS REVEALED BY ATR-FTIR SPECTROSCOPY METHOD, Mamaeva P.V., Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E.V.	220
12. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С ФИБРИНОГЕНОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ СВЕТОРАССЕЯНИЯ, Бурханов И.С., Кириченко М.Н., Чайков Л.Л., Булычев Н.А.	221
STUDY OF THE MECHANISM OF INTERACTION OF IRON OXIDE NANOPARTICLES WITH BLOOD PLASMA FIBRINOGEN USING LIGHT SCATTERING, Burkhanov I.S., Kirichenko M.N., Chaikov L.L., Bulychev N.A.	222
13. ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ PLGA НАНОЧАСТИЦ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ИНТРАВИТАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ, Мельников П.А., Валихов М.П., Малиновская Ю.А.	223
INVESTIGATION OF PLGA NANOPARTICLE DISTRIBUTION INTO THE PARIETAL CORTEX USING INTRAVITAL IMAGING TECHNIQUE, Melnikov P.A., Valikhov M.P., Malinovskaya J.A.	224
14. ЛАЗЕРНАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ НОВЫХ АСПЕКТОВ В ОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК, Самоделкин А.Г., Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Белов А.А., Гущин В.А., Петров В.А.	225
LASER INTERFERENCE MICROSCOPY TO IDENTIFY NEW ASPECTS OF THE IMPACT OF LOW LEVEL LASER THERAPY ON FUNCTIONAL CELL MORPHOLOGY, Samodelkin A.G., Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Belov A.A., Guschin V.A., Petrov V.A.	226
15. НАНОЗИМЫ "ИСКУССТВЕННАЯ ПЕРОКСИДАЗА" ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОАНАЛИЗА, М.А. Комкова, А.А. Карякин	227
NANOZYMES 'ARTIFICIAL PEROXIDASE' FOR BIOTECHNOLOGY AND BIOANALYSIS, M.A. Komkova, A.A. Karyakin	228
16. ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВАРИАНТОВ ШТАММА MOSCOW ВИРУСА СЕНДАЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В РАЗНЫХ СИСТЕМАХ РЕПЛИКАЦИИ, Зайнутдинов С.С., Романенко М.В., Кочнева Г.В.	228
ONCOLYTIC ACTIVITY OF GENOVARIENTS OF THE MOSCOW STRAIN OF SENDAI VIRUS, OBTAINED IN DIFFERENT REPLICATION SYSTEMS, Zainutdinov S.S., Romanenko M.V., Kochneva G.V.	229
17. ПОДАВЛЕНИЕ ГЕНА STAT ПРИ ПОМОЩИ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ РНК КАК ПОДХОД К ТЕРАПИИ НЕАЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ, А.А.Никольский, И.П.Шиловский, С.М.Андреев, К.В.Кожихова, Е.Д.Барвинская, Л.И.Вишнякова, А.А.Бабахин, А.Р.Гайсина, М.Р.Хаитов	230
SUPPRESSION OF STAT GENE BY RNA INTERFERENCE AS AN APPROACH TO THERAPY OF NONALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA, A.Nikolskii, I.Shilovskiy, S.Andreev, K.Kozhykhova, E.Barvinskaya, L.Vishniakova, A.Babakhin, A.Gaisina, M.Khaitov	231
18. ПРЕИМУЩЕСТВО УЛЬТРАЗВУКОВОЙ МОДЕЛИ ДЕПРЕССИИ ПО СРАВНЕНИЮ С КЛАССИЧЕСКОЙ МОДЕЛЬЮ ХРОНИЧЕСКОГО МЯГКОГО СТРЕССА, Зоркина Я.А., Зубков Е.А., Морозова А.Ю.	232
ULTRASOUND MODEL OF DEPRESSION COMPARED WITH THE CLASSIC MODEL OF CHRONIC MILD STRESS, Zorkina Y.A., Zubkov E.A., Morozova A.Y.	233
19. РЕГУЛИРОВАНИЕ СКОРОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ И СТРУКТУРЫ ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С РАЗЛИЧНЫМ PH, М.Н.Кириченко, И.С.Бурханов, Л.Л.Чайков, Н.А.Булычев ...	234
REGULATION OF THE RATE OF FORMATION AND STRUCTURE OF FIBRINE GEL USING IRON OXIDE NANOPARTICLES WITH DIFFERENT PH, M.Kitichenko, I.Burkhanov, L.Chaikov, N.Bulychev	235
20. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕРАНОСТИКИ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА, А.С. Семкина, М.А. Абакумов, А.С. Скориков, А.В. Иванова, А.Г. Мажуга, В.П. Чехонин	237
MODERN THERANOSTIC AGENTS IN DIAGNOSTICS AND TREATMENT OF BRAIN TUMORS, A.S. Semkina, M.A. Abakumov, A.S. Skorikov, A.V. Ivanova, A.G. Majouga, V.P. Chekhonin	238
21. СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ ОБЪЕКТОВ НАНОМЕТРОВОГО РАЗМЕРА МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ, Кононова И.В., Мамаева С.Н., Павлов А.Н., Гольдерова А.С., Кириллина М.П., Афанасьева Л.Н., Никифоров П.В.	239
PREPARATION OF HUMAN BLOOD SAMPLES FOR OBTAINING A NANOMETER-SIZED OBJECTS IMAGE BY ELECTRON MICROSCOPY, Kononova I.V., Mamaeva S.N., Pavlov A.N., Golderova A.S., Kirillina M.P., Afanasyeva L.N., Nikiforov P.V.	240

22. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОБКЛАДОЧНЫХ КЛЕТОК КРЫС И ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ХРОНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА, Воронова А.Д., Степанова О.В., Валихов М.П., Чадин А.В., Семкина А.С., Абакумов М.А., Решетов И.В., Чехонин В.П.....	240
COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF TRANSPLANTATION OF RAT AND HUMAN OLFACTORY ENSHEATHING CELLS WITH DIFFERENT TYPES OF CHRONIC DAMAGE OF SPINAL CORD, Voronova A.D., Stepanova O.V., Valihov M.P., Chadin A.V., Semkina A.S., Abakumov M.A., Reshetov I.V., Chekhonin V.P.....	242
23. СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА CBS-ПИРОФОСФАТАЗЫ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПОСОБОВ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЭТОГО ФЕРМЕНТА, Е.Ю. Сошинская, И.Д. Дельцов, Л.А. Дадинова.....	243
STRUCTURAL RESEARCH OF CATALYTIC DOMAIN OF CBS-PYROPHOSPHATASE BY A SMALL-ANGLE X-RAY SCATTER FOR DETERMINING METHODS OF REGULATION OF ACTIVITY OF THE ENZYME, E.Y. Soshinskaia, I.D. Deltzov, L.A. Dadinova	244
24. ФРАГМЕНТЫ ОДНОТЯЖЕВЫХ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С РЕТИНОБЛАСТОМОЙ: СВЯЗЬ С ОНКОГЕНЕЗОМ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ, К.В. Ермаков, А.А. Бухвостов.....	245
SINGLE STRANDED DNA FRAGMENTS IN RETINOBLASTOMA PATIENT BLOOD PLASMA: LINK TO ONCOGENESIS AND DIAGNOSTIC VALIDITY, K.V. Ermakov, A.A. Bukhvostov	246
25. ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, Степаненко А.А., Андреева С.В., Корец К.В., Микитенко Д.А., Гулеюк Н.Л., Баклаушев В.П., Чехонин В.П.....	247
CHROMOSOMAL INSTABILITY AND GENETIC HETEROGENEITY AS A UNIVERSAL MECHANISM OF THERAPEUTIC RESISTANCE OF TUMOR CELLS, Stepanenko A.A., Andreieva S.V., Korets K.V., Mykytenko D.O., Huleyuk N.L., Baklaushev V.P., Chekhonin V.P.	248

УДК 579.61

АКТИВНОСТЬ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИЗОСТАФИНА С АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ

Шестаков Н.В., Гришин А.В., Ляшук А.М., Лаврова Н.В., Струкова Н.В., Генералова М.С., Рязанова А.В., Карягина А.С., Лунин В.Г.

ФГБУ «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства
Здравоохранения России, Москва, Россия
123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18
e-mail: nikita1305@mail.ru

Получен вариант антибактериального фермента лизостафина с альбумин-связывающим доменом. Химерный белок обладает несколько сниженной по сравнению с нативным лизостафином активностью на клетках *S. aureus*, но существенно улучшенными фармакокинетическими характеристиками, что делает его перспективным для дальнейшего исследования.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, лизостафин, антибактериальные лизины, фармакокинетика, альбумин-связывающий домен, антибиотикорезистентность.

На сегодняшний день антибиотико-устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus* являются одной из основных проблем современного здравоохранения. Одним из вариантов решения данной проблемы является разработка лизинов - антибактериальных ферментов, способных разрушать клеточную стенку бактерий, в том числе устойчивых к антибиотикам. Плюсами лизинов являются: их высокая активность, специфичность и, предположительно, низкая вероятность развития устойчивости. Существенным недостатком лизинов является их быстрое выведение из системного кровотока.

Чтобы решить эту проблему был сконструирован рекомбинантный вариант лизостафина с альбумин-связывающим доменом белка G *Streptococcus* spp. Лизостафин является одним из наиболее изученных и активных анти-стафилококковых лизинов. Альбумин-связывающий домен активно используется для того, чтобы увеличить эффективную молекулярную массу химерного белка за счет взаимодействия с альбумином крови. Увеличение молекулярной массы приводит к снижению способности организма

выводить белок через гломерулярный фильтр в почках, что позволяет существенно увеличить время циркуляции белка в кровотоке [1].

Оказалось, что добавление альбумин-связывающего домена снижает активность лизостафина. Время просветления суспензии клеток *S. aureus* ATCC 29213 наполовину 1 мкг/мл лизостафина с альбумин-связывающим доменом (Lst-AIBD) увеличивается вдвое по сравнению с исходным лизостафином (Lst) – с $11,0 \pm 1,0$ до $22,1 \pm 1,6$ мин, а при добавлении к лизостафину с альбумин-связывающим доменом крысиного сывороточного альбумина (Lst-AIBD+RSA) его активность снижается еще в 3,7 раза, до $80,4 \pm 12,9$ мин. Проведенные на крысах исследования фармакокинетических свойств Lst и Lst-AIBD показали, что период полувыведения в фазе элиминации для Lst составил 2,1 часа, а для Lst-AIBD – 7,7 часа; при этом из-за крайне быстрого выведения большей части лизостафина в первые 25 минут после инъекции, отношение площадей под фармакокинетическими кривыми (AUC) для Lst-AIBD и Lst составило почти 90 раз ($385,9$ и $4,3$ мг*час/л соответственно).

Таким образом, добавления альбумин-связывающего домена позволяет существенно увеличить время циркуляции лизостафина в крови животных. При этом, несмотря на уменьшение активности рекомбинантного белка, исследуемый белок представляется перспективным, поскольку другие способы увеличения времени циркуляции лизоцинов в крови, такие как пегилирование, полностью лишают эти белки активности [2]. В будущем предполагается дальнейшее изучение и оптимизация свойств данного белка.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ № 18-15-00235.

Литература:

1. Frejd F. Half-Life Extension by Binding to Albumin through an Albumin Binding Domain // *Therapeutic proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives*. 2012. P. 269–283.
2. Walsh S., Shah A., Mond J. Improved Pharmacokinetics and Reduced Antibody Reactivity of Lysostaphin Conjugated to Polyethylene Glycol // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. Vol. 47, № 2. P. 554–558.

UDC 579.61

ACTIVITY AND PHARMACOKINETICS OF LYSOSTAPHIN WITH ALBUMIN-BINDING DOMAIN

Shestak N.V., Grishin A.V., Lyashchuk A.M., Lavrova N.V., Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V., Karyagina A.S., Lunin V.G.

N.F. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia
 123098, Moscow, Gamaleya str., 18
 e-mail: nikita1305@mail.ru

A fusion protein consisting of antibacterial enzyme lysostaphin and an albumin-binding domain was constructed. This fusion protein is less active against *S. aureus* cells than native lysostaphin. However, the pharmacokinetic characteristics of such fusion protein are improved dramatically, making it a promising candidate for further development.

Key words: *Staphylococcus aureus*, lysostaphin, antibacterial lysins, pharmacokinetics, albumin-binding domain, antibiotic resistance.

Antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus* are one of the major healthcare problems today. One of the possible ways to tackle this problem is the development of antibacterial lysins, which are enzymes capable of hydrolyzing the cell walls of bacteria, including antibiotic resistant strains. The advantages of antibacterial lysins include their high activity, specificity and presumed low propensity to resistance development. On the other hand, a major drawback is fast elimination from systemic circulation.

To this end we constructed a recombinant fusion protein consisting of lysostaphin and albumin-binding domain from streptococcal protein G. Lysostaphin is one of the most active and extensively studied anti-staphylococcal lysin. Albumin-binding domain is often used to increase the effective molecular weight of a protein through its interaction with albumin. The increase in effective molecular weight prevents the elimination of the recombinant protein by glomerular filtration in kidneys and increases the residence time in the systemic circulation [1].

The activity of lysostaphin with albumin-binding domain (Lst-AIBD) was decreased. The time to half-clearing of *S. aureus* ATCC 29213 cell suspension by 1 µg/mL Lst-AIBD was twice that for 1 µg/mL lysostaphin (Lst) – 22.1 ± 1.6 min vs. 11.0 ± 1.0 min. Addition of rat serum albumin to the reaction mixture further decreased the activity

of Lst-AIBD by 3.7 times, to 80.4 ± 12.9 min. The pharmacokinetic characteristics of Lst-AIBD were studied in rats. The terminal half-life of Lst was 2.1 h, while that of Lst-AIBD 7.7 h. Moreover, lysostaphin was almost completely eliminated during the first 25 minutes after injection, and the area under the curve (AUC) for Lst-AIBD was almost 90 times greater compared to Lst (385.9 vs 4.3 mg*h/L).

To sum up, the addition of albumin-binding domain dramatically increases the residence time of lysostaphin in systemic circulation in rats. On the other hand, the activity of the fusion protein is decreased. However, other approaches to the improvement of pharmacokinetic characteristics such as PEGylation, were shown to fully eliminate the activity [2], thus making Lst-AIBD a promising slow-elimination lysin variant. Further investigation and optimization of lysostaphin with albumin-binding domain is planned.

The work was supported by Russian Science Foundation grant № 18-15-00235.

References:

1. Frejd F. Half-Life Extension by Binding to Albumin through an Albumin Binding Domain // *Therapeutic proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives*. 2012. P. 269–283.
2. Walsh S., Shah A., Mond J. Improved Pharmacokinetics and Reduced Antibody Reactivity of Lysostaphin Conjugated to Polyethylene Glycol // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. Vol. 47, № 2. P. 554–558.

УДК: 615.032.13

АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАНОЭМУЛЬСИЙ А-ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ

В.А.Щелконогов¹, А.В.Шипелова¹, А.М.Синебрюхова¹, Е.С.Дарнотук¹, Н.С.Шастина¹, В.А.Щелконогов², К.С.Жигалова², О.А.Баранова², А.В.Чеканов², К.Д.Казаринов³, Э.Ю.Соловьева⁴, А.И.Федин⁴

¹МИРЭА-Российский технологический университет (ИТХТ), Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, 86, e-mail: vasiliy9999@yandex.ru

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

³ФГБУН Институт радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова РАН, Россия, 141190, Фрязино, пл. Введенского, 1,

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Получены наноэмульсии с липоевой кислотой (ЛК) на основе фосфатидилхолина (ФХ) или Плуриона Ф68, характеризующиеся высокой стабильностью (более двух месяцев) при хранении при комнатной температуре. Оценено влияние полученных ЛК-наноэмульсий на агрегацию тромбоцитов, обусловленную арахидоновой кислотой (АК).

Ключевые слова: наноэмульсии, липоевая кислота, тромбоциты, арахидоновая кислота.

Цереброваскулярные заболевания являются наиболее распространёнными и стоят на втором месте после ишемической болезни сердца среди заболеваемости и смертности во всем мире. Ежегодно в мире инсульт переносят около 6 млн. человек, а в России – более 350 тыс. Основными патогенетическими механизмами возникновения ишемии головного мозга являются: микроциркуляторные нарушения, снижение мозгового кровотока, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, повреждение ГЭБ и др. Поэтому комплексная терапия хронической и острой ишемии головного мозга должна включать в себя применение препаратов, обладающих антиоксидантным действием и влияющими на агрегацию тромбоцитов. Одним из наиболее универсальных и перспективных антиоксидантов в комплексной терапии ишемии головного мозга является липоевая кислота (ЛК) [1].

Целью данной работы является получение наноэмульсий, содержащих липоевую кислоту, а также изучение влияния полученных ЛК-наноэмульсий на агрегацию тромбоцитов в плазме человека.

Ранее были получены липосомы с ЛК, характеризующиеся 85%-ной эффективностью включения субстанции и стабильностью при длительном хранении. Также было изучено влияние липосом с ЛК на агрегацию тромбоцитов [2,3].

В настоящей работе были получены и охарактеризованы наноэмульсии с липоевой кислотой и также изучена их антиагрегационная эффективность.

Прямые наноэмульсии («масло-в-воде») с липоевой кислотой были получены методом диспергирования под действием ультразвука и последующим удалением избытка органического растворителя и водной

фазы с целью повышения концентрации ЛК в наночастицах (НЧ). Размер, индекс полидисперсности и дзета-потенциал нанодисперсий (НД) определяли методом динамического светорассеяния (ДРС). В результате проведенных исследований были получены наноэмульсии с липоевой кислотой на основе фосфатидилхолина (соотношение ФХ:ЛК=1:2, ЛК-ФХ) либо 0.3% Плюроники Ф68 (ЛК-Ф68) в фосфатном буферном растворе (рН 7.4), характеризующиеся стабильностью при хранении при комнатной температуре в течение более 2 месяцев. Размер наночастиц ЛК-ФХ колебался в диапазоне 110–190 нм, а среднее значение индекса полидисперсности составило 0.25. Нанодисперсии ЛК с 0.3% раствором Плюроники Ф68 включали в себя 2 фракции НЧ: 50–90 нм (10–20%) и 130–350 нм (80–90%), индекс полидисперсности составил 0.3. Необходимо отметить, что концентрация ЛК в полученных наноэмульсиях была в 1.5 раза больше, чем в ранее полученных нами ЛК-липосомах.

На следующем этапе работы были проведены сравнительные исследования влияния полученных нанодисперсий, содержащих ЛК, на агрегацию тромбоцитов в плазме крови, взятой у здоровых доноров. Для проведения данных исследований был использован оптический четырехканальный агрегометр Helena AggRAM (Великобритания). Агрегацию тромбоцитов индуцировали арахидоновой кислотой. В результате проведенных исследований было обнаружено, что фосфатидилхолиновые наноэмульсии, содержащие ЛК (СЛК=1.1–4.0 мМ), подавляли агрегацию тромбоцитов, обусловленную АК, на 30–81%. Вместе с этим было выявлено, что пустые фосфатидилхолиновые наноэмульсии (СФХ=0.13–0.5 мМ) незначительно (на 10–15%) уменьшали агрегацию Тц, вызванную этим индуктором. Кроме того наноэмульсии состава ЛК-Ф68 (СЛК=1.3–4 мМ) эффективней наноэмульсий ЛК-ФХ ингибировали агрегацию Тц (50–81%), обусловленную АК. В дополнении было установлено, что Ф68 в диапазоне (в интервале) концентраций 0.01–1.4% не оказывал влияния на агрегацию тромбоцитов.

Таким образом, проведенные исследования в данной работе показывают, что полученные наноэмульсии с липоевой кислотой на основе ФХ или Ф68 эффективно подавляют агрегацию Тц, что позволяет в дальнейшем, после проведения дополнительных исследований, использовать полученные наночастицы с ЛК в качестве нового возможного лекарственного средства при комплексной терапии сосудистых заболеваний головного мозга.

Работа выполнена в рамках Государственного задания (№ госрегистрации 1 04 011 056).

Литература:

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. // М.: "Медицина", 2001., 328 с.
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 с.
3. Щелконогов В.А., Сорокоумова Г.М., Баранова О.А. и др. Липосомальная форма липоевой кислоты: получение и определение антиагрегационной и антиоксидантной активности. // Биомедицинская химия. 2016, 5, 577-583 с.

УДК: 615.032.13

ANTIPLATELET EFFICIENCY OF NANOEMULSIONS OF A-LIPOIC ACID

V.Shchelkonogov¹, A.Shipelova¹, A.Sinebryukhova¹, E.Darnotuk¹, N.Shastina¹, V.Shchelkonogov², K.Zhigalova², O.Baranova², A.Chekanov², Kazarinov³, E.Solovyova⁴, A.Fedin⁴

¹MIREA-Russian technological University (ITHT), Russia, 119571, Moscow, 86 Vernadsky Avenue, Moscow, 86 e-mail: vasiliy9999@yandex.ru

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

³Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, RAS (Fryasino branch) , Russia, 141190, Fryazino, Moscow region, Vvedensky sq., 1

⁴Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Russia, 117997, Moscow , Ostrovitianov str. , 1

Nanoemulsions with lipoic acid (LA), based on phosphatidylcholine (PC) or Pluronic F68, characterized by high stability (more than two months) at room temperature storage are obtained. The influence of the obtained LA-nanoemulsions on platelet aggregation caused by arachidonic acid (AA) is estimated.

Key words: nanoemulsions, lipoic acid, platelets, arachidonic acid.

Cerebrovascular diseases are the most widespread and are on the second place after ischemic (coronary) heart disease among morbidity and mortality around the world. About 6 million people suffer the brain stroke

every year in the world, and more than 350 thousand - in Russia. The main pathogenetic mechanisms of cerebral ischemia are: microcirculatory disorders, reduction (decrease) of cerebral blood flow, occurrence and progression of oxidative stress, damage of BBB, etc. Therefore, (the) complex therapy of chronic and acute cerebral ischemia should include the use of drugs possessing antioxidant action (effects) and influencing on platelet aggregation. One of the most universal and promising (perspective) antioxidants in the complex treatment of cerebral ischemia is lipoic acid (LA) [1].

The purpose of this work is obtaining (receiving) lipoic acid nanoemulsions, and studying the influence of obtained LA-nanoemulsions on platelet aggregation in human plasma.

Earlier liposomes with LA were obtained, characterized by 85% efficiency of inclusion of substance in nanoparticles and stability during long-term storage. The effect of liposomes with LA on platelet aggregation was also investigated [2, 3].

In the present work, the nanoemulsions with lipoic acid were obtained and characterized, and their antiplatelet efficiency was studied.

Direct nano-emulsions ("oil-in-water") with lipoic acid were obtained by dispersion under the action of ultrasound and subsequent removal of excess organic solvent and aqueous phase in order to increase the concentration of LA in nanoparticles (NP). The size, polydispersity index and zeta-potential of nanodispersions (ND) were determined by the method (technique) of dynamic light scattering (DRS). As a result of the conducted researches, nanoemulsions with lipoic acid, based on phosphatidylcholine (PC: LA ratio 1:2, LA-PC) or 0.3% Pluronic F68 (LA-F68) in phosphate buffer solution (pH 7.4) characterized by stability at storage at room temperature for more than 2 months has been obtained. The size of LA-PC nanoparticles fluctuated in the range of 110–190 nm, and the average value of the polydispersity index was 0.25. LA nanodispersions with a 0.3% Pluronic F68 solution included two fractions of NP: 50–90 nm (10–20%) and 130–350 nm (80–90%), the polydispersity index was 0.3. It should be noted that the concentration of LA in the received nanoemulsions was 1.5 times higher (more) than in the previously obtained LA-liposomes.

At the next stage of the research work, comparative studies of the effect of the obtained nanodispersions, containing LA, on platelet aggregation in blood plasma, taken from healthy donors, were carried out. For conducting these studies, the optical four-channel aggregometer Helena AggRAM (UK) was used. Aggregation of platelets was induced by arachidonic acid. As a result of the conducted researches, it has been found that phosphatidylcholine nanoemulsions, containing LA (CLA=1.1–4.0 mM), suppressed platelet aggregation, caused by AA, for 30–81%. At the same time (therewith), it has been revealed that empty phosphatidylcholine nanoemulsions (Cpc=0.13–0.5 mM) slightly (for 10–15%) reduced platelet aggregation, caused by this inducer. In addition, nanoemulsions of LA-F68 composition (CLA=1.3–4 mM) more efficiently inhibited platelet aggregation (for 50–81%), caused by AA, than LA-PC nanoemulsions. In addition, it has been established that F68 in the range of concentrations of 0.01–1.4% did not influenced on platelet aggregation.

Thus, the studies performed in this research work, show that the obtained nanoemulsions with lipoic acid based on PC or F68 effectively suppress (inhibite) platelet aggregation of, which further allows, after additional researches, to use the obtained nanoparticles with LA as a new potential drug for complex therapy of brain vascular diseases.

The work was performed within the State task (state registration number 1 04 011 056).

References:

1. Gusev E.I., Skvortsova V.I. Ischemia of the brain. // M.: "Medicine", 2001., 328 p.
2. Shchelkonogov V.A., Sorokoumova G.M., Baranova O.A. et al. Liposomal forms of lipoic acid: preparation and studying of effect on platelet aggregation 8 Moscow international congress "Biotechnology: state of the art and prospects of development". 2015. Vol. 1. P. 119 –120.
3. 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.

УДК 579.61

БИОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА МЕТИЛОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *METHYLOPHILUS QUAYLEI* И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Мохамед А.М.Х.А.¹, Сорокин В.В.², Складнев Д.А.², Пшеничникова А.Б.¹

¹Институт тонких химических технологий, РТУ МИРЭА, Москва, Россия 119454, пр. Вернадского, 86.;
 e-mail: aber.mohamed@yandex.ru

²ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН 119071, Ленинский проспект, 33, корп. 2, Москва

Получены наночастицы серебра в присутствии грамотрицательной облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei*, изучены их свойства и антибиопленочное действие.

Ключевые слова: наночастицы серебра, биосинтез, биопленки, метилотрофные бактерии.

Наночастицы серебра являются важнейшим объектом нанотехнологии благодаря своим антимикробным и другим свойствам, представляющим интерес для медицинского применения. Особые перспективы использования наночастиц серебра открываются в области борьбы с множественной лекарственной устойчивостью патогенных бактерий, в том числе в составе биопленок. В биопленках бактерии формируют повышенную резистентность к антибиотикам и биоцидным агентам, что является причиной неэффективности антибиотикотерапии в лечении таких инфекций, как туберкулез. Существенное повышение чувствительности бактерий в биопленках к антибиотикам наблюдается в присутствии комбинаций антибиотиков и специфических антибиопленочных веществ, среди которых производные индола, имидазола, N-ацилгомосерин лактонов, катионные пептиды, жирные кислоты и наночастицы серебра и других металлов.

Для получения наночастиц серебра используют химические, физические и биологические методы [1]. Биологические методы основаны на химическом восстановлении соединений серебра клетками и продуктами жизнедеятельности бактерий, грибов, водорослей [2], растений и дальнейшем формировании наночастиц с последующей их стабилизацией. Бактерии представляют интерес благодаря видовой специфичности в образовании наночастиц определенной формы и размера, а также повышению их стабильности.

В настоящей работе для получения наночастиц серебра использовали новый объект - грамотрицательную облигатную метилотрофную бактерию *Methylophilus quaylei*, способную расти на простых синтетических средах с метанолом. При добавлении нитрата серебра (0,167 г/л) к нативной культуральной жидкости *Methylophilus quaylei* или бесклеточному супернатанту и термостатировании при 40°C и pH 10.5 в течение 24 ч методами UV-спектроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии и рентгеновского микроанализа наблюдали образование наночастиц серебра. Наибольший выход наночастиц серебра наблюдается в присутствии клеток в стационарной фазе роста. По данным фотонной корреляционной спектроскопии в этих условиях преобладают наночастицы размером 20-50 нм, кубической формы.

Антибиопленочное действие полученных наночастиц серебра тестировали на биопленках *Methylophilus quaylei* MT, предварительно выращенных в течение 24 часов на полипропиленовых купонах размером 10×10 мм в синтетической питательной среде, содержащей 1 об.% метанола, при 30°C и pH 7.0. Раствор наночастиц серебра, полученных с использованием бесклеточной культуральной жидкости (БКЖ) или свежей питательной среды (контроль), добавляли к уже сформированным биопленкам и термостатировали еще 24 часа. Интенсивность биопленкообразования оценивали путем окрашивания биопленки кристаллическим фиолетовым, определения в ней количества жизнеспособных бактерий (в виде колониеобразующих единиц (КОЕ) и визуализации методом световой микроскопии. Если купон с биопленкой переносили в свежую питательную среду (контроль), величина КОЕ/мл составила 3.2×10^7 . В присутствии раствора наночастиц, разбавленного в 2 раза исходной БКЖ - 2.9×10^4 КОЕ/мл (0.09%), а в 4 раза - 8.8×10^4 КОЕ/мл (0.27%). Это существенное антибиопленочное действие обусловлено не только присутствием наночастиц серебра, но и компонентами БКЖ – экзополисахаридом и другими метаболитами, поскольку при добавлении к биопленкам БКЖ без наночастиц также наблюдалось уменьшение величины КОЕ/мл до 3.8×10^5 . Микроскопирование обнаружило изменение формы клеток и структуры биопленок в присутствии наночастиц.

UDC 579.61

BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES BY METHYLOPHILUS QUAYLEI, THEIR ANTIBIOFILM ACTIVITIES, AND CHARACTERIZATIONS

Mohamed A.M.H.A.¹, Sorokin V.V.², Skladnev D.A.², Pshenichnikova A.B.¹

¹Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University, Moscow, Russia, 119571, Vernadsky Avenue, 86.; e-mail: aber.mohamed@yandex.ru

²Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences» 119071, Leninsky prospect, 33, build. 2, Moscow

Silver nanoparticles were obtained using gram-negative obligate methylotrophic bacterium *Methylophilus quaylei*, their properties and anti-biofilm effect were studied.

Key words: silver Nanoparticles, biosynthesis, biofilms, methylotrophic bacteria.

Silver nanoparticles are the most important object of nanotechnology due to its antimicrobial and other interesting properties for medical use. Special prospects for silver nanoparticles applications are opening up in the field of combating multidrug resistance of pathogenic bacteria, including in biofilms composition. In biofilms, bacteria exhibit increasing resistance to antibiotics and biocidal agents, which is the reason for the antibiotic therapy ineffectiveness in the treatment of such infections as tuberculosis. It is observed that bacterial sensitivity in biofilms is significantly increased to antibiotics in the presence of antibiotics combinations with specific antibiofilm substances, including derivatives of indole, imidazole, N-acylhomoserine lactones, cationic peptides, fatty acids, and silver nanoparticles and other metals.

Chemical, physical and biological methods are used to produce silver nanoparticles [1]. Biological methods are based on the chemical reduction of silver compounds by the cells and metabolic products of bacteria, fungi, algae [2], plants, and the further formation of nanoparticles with their subsequent stabilization. Bacteria are interesting due to the specificity of the species in the formation of nanoparticles of a certain shape and size, as well as an increase in their stability.

In the present work, to obtain silver nanoparticles, a new object was used – the gram-negative obligate methylotrophic bacterium *Methylophilus quaylei*, capable of growing on simple mineral media with methanol. When silver nitrate (0.167 g/l) was added to liquid native culture *Methylophilus quaylei* or cell-free supernatant having 10.5 pH and exposed to a temperature at 40 °C, silver nanoparticles were observed by a UV- spectrophotometer every 24 hours, transmission electron microscopy and X-ray microanalysis. The highest yield of silver nanoparticles is observed in the presence of cells in the stationary phase of growth. According to the data of photon correlation spectroscopy, under these conditions, nanoparticles with a size of 20-50 nm, cubic shape, prevail were formed.

The anti-biofilm effect of the obtained silver nanoparticles was tested on *Methylophilus quaylei* MT biofilms, pre-grown for 24 hours on polypropylene coupons of 10×10 mm in mineral medium containing 1% by volume of methanol, at 28 °C and pH 7.0. Silver nanoparticles solution obtained using cell-free culture (CFC) was added to the pre-grown biofilms or a fresh mineral medium (control) and incubated for another 24 hours. The intensity of biofilm formation was assessed by crystal violet staining, determining the colony forming unit, and visualizing by light microscopy. When biofilm coupon was transferred to a fresh mineral medium (control), the CFU/ml was 3.2×10⁷. In the presence of nanoparticles solution diluted 2 times with the original CFC- CFU/ml was 2.9×10⁴ (0.09%), and 8.8×10⁴ (0.27%) when diluted 4 times. This significant anti-biofilm effect is not only due to the presence of silver nanoparticles but also to the CFC components – exopolysaccharide and other metabolites since CFC was added to biofilms without nanoparticles a significant decrease in CFU/ml to 3.8×10⁵ was also observed. Microscopic examination revealed changes in the cell shape and biofilm structure in the presence of nanoparticles.

References:

1. Kulkarni N., Muddapur U. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review // *Journal of Nanotechnology*. –2014. – Vol. 2014. – P.1-8.
2. Pereira L., Mehboob F., Stams A.J., Mota M.M., Rijnaarts H.H., Alves M.M. Metallic nanoparticles: microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation // *Critical Reviews in Biotechnology*. –2015. –Vol. 35, №1. – P.114-128.

УДК: 577.114.7:577.352.2:616-006

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОСОМ, НАГРУЖЕННЫХ ЛИПОФИЛЬНЫМ ПРОЛЕКАРСТВОМ МЕЛФАЛАНА, С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ

 Д.С.Третьякова¹, И.М.Ле-Дейген², Е.В.Кудряшова², Е.Л.Водовозова³

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10
 e-mail: office@ibch.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1
 e-mail: info@rector.msu.ru

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10

Получены дисперсии 100-нм-липосом, состоящих из природного фосфатидилхолина, диглицеридного сложноэфирного конъюгата мелфалана (Mlph-DG) и фосфатидилинозита (PI). Исследовано взаимодействие липосом с сывороточным альбумином с помощью ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: липосомы, липофильные пролекарства, мелфалан, ИК-спектроскопия

Взаимодействие липосом, предназначенных для введения в кровотоки, с компонентами крови является первым физиологическим барьером на пути к целевым клеткам и тканям. В данной работе с помощью ИК спектроскопии Фурье (FTIR) исследовали связывание сывороточного альбумина (БСА) с липосомальной формой липофильного пролекарства противоопухолевого препарата мелфалана (Mlph-DG), показавшей терапевтическую эффективность *in vivo* [1]. Были получены 100-нм-липосомы из яичного фосфатидилхолина (ePC), несущие в липидном бислое Mlph-DG и/или PI. Записывали ИК-спектр липосом в буфере PBS, а затем добавляли БСА и инкубировали 20 мин при 37°C. В ходе инкубации записывали спектры через каждые 5 мин и анализировали изменения в положениях и формах пиков. О характере взаимодействия липосом с белком судили по нескольким параметрам: изменению подвижности углеводородных цепей (сдвиг частот пиков в области валентных колебаний CH₂ 2930-2850 см⁻¹), изменению степени гидратации карбонильных групп липидов (вклад колебаний от высоко гидратированных липидов в области частот 1719-1732 см⁻¹) и изменению структуры белка (изменения соотношения элементов вторичной структуры белка – α-спираль/β-лист/β-поворот/неупорядоченная цепь – в ходе инкубации в пике амид I и вклад агрегатов белка в областях частот 1618-1627 см⁻¹ и 1686-1696 см⁻¹).

Для липосом только из ePC инкубация с белком не привела к изменению подвижности углеводородных цепей – БСА ассоциирован с поверхностью бислоя, но не внедряется в него. Введение в бислой 10 % Mlph-DG создает локальные дефекты поверхности, изменяющие взаимодействия с белком – подвижность CH₂ увеличивается. Можно предположить, что БСА подходит ближе к карбонильным (сложноэфирным) группам липидов, принося свою гидратную оболочку, из-за чего к 10 мин инкубации увеличивается гидратация этих групп, а затем белок непосредственно взаимодействует с карбонилами и заякоривается. Введение 10 % PI в бислой из ePC также вносит дефекты. При добавлении белка увеличивалась текучесть бислоя. Степень гидратации карбонильных групп значительно снижалась непосредственно после добавления БСА за счет электростатических взаимодействий, хотя к концу инкубации возвращалась к прежнему значению, за счет гидратной оболочки последующих молекул БСА. Для БСА наблюдали снижение α-спиралей в белке и его агрегацию, которая усиливалась в ходе инкубации. Предположительно, БСА заякоривается в бислое, взаимодействуя с карбонильными группами липидов. Хотя по отдельности Mlph-DG и PI создают определенные дефекты в бислое, липосомы с 10 % Mlph-DG и 10 % PI наоборот не позволяют белку глубоко внедриться в мембрану. При инкубации с БСА не было влияния на подвижность углеводородных цепей. Гидратированность карбонильных групп увеличивалась лишь в первые 5 мин, что может свидетельствовать о появлении гидратной оболочки альбумина вблизи этих карбонильных групп. Видимо, белок претерпевает изменения в структуре, далее агрегирует и создает слабосвязанную корону на поверхности бислоя без его нарушения. Мы полагаем, что липосомы с Mlph-DG и PI защищены от внедрения белка за счет «укрепляющих» электростатических взаимодействий между положительно заряженным при pH 7.0 остатком мелфалана и фосфатной группой PI.

Наши результаты во многом согласуются с результатами изучения целостности бислоя данных липосом в сыворотке с помощью флуоресцентных методов [2].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-04-01585).

Литература:

1. Kuznetsova N.R., Stepanova E.V., Peretolchina N.M., Khochenkov D.A., Boldyrev I.A., Bovin N.V., Vodovozova E.L. Targeting liposomes loaded with melphalan prodrug to tumour vasculature via the Sialyl Lewis X selectin ligand // *J. Drug Target.* 2014. Vol. 22. №3. P. 242–250.
2. Tretiakova D.S., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Mikhalyov I.I., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Evtushenko E.G., Vodovozova E.L. Influence of stabilizing components on the integrity of antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug in the bilayer // *Coll. Surf. B Biointerf.* 2018. Vol. 166. P. 45–53.

UDC: 577.114.7:577.352.2:616-006

INTERACTIONS OF LIPOSOMES LOADED WITH MELPHALAN LIPOPHILIC PRODRUG IN THE BILAYER WITH SERUM ALBUMIN: FTIR-SPECTROSCOPY RESEARCH

D.Tretiakova¹, I.Le-Deygen², E.Kudryashova², E.Vodovozova³

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Russian Federation, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya, 16/10
e-mail: office@ibch.ru

²Lomonosov Moscow State University, Russian Federation, 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1
e-mail: info@rector.msu.ru

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Russian Federation, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya, 16/10

Liposomal formulations were prepared from natural phosphatidylcholine, dioleoylglycerol conjugate of melphalan (Mlph-DG) and phosphatidylinositol (PI). Liposome interactions with serum albumin (BSA) were assessed by FTIR-spectroscopy.

Key words: liposomes, lipophilic prodrugs, melphalan, FTIR-spectroscopy

Interactions of liposomes intended for intravenous injections, with blood components are the first physiological barrier on the way to the target cells and tissues. In this work, we used FTIR-spectroscopy to study serum albumin binding with the liposomal formulation of melphalan lipophilic prodrug (Mlph-DG) that showed therapeutic efficacy in vivo [1]. 100-nm-liposomes were prepared on the basis of natural phosphatidylcholine (ePC), loaded with dioleoylglycerol ester of melphalan (chemotherapeutic alkylating agent) Mlph-DG and/or phosphatidylinositol (PI). FTIR spectrum was registered initially in PBS and afterwards BSA was added and incubated with liposomes for 20 minutes at 37C. During incubation we registered spectra every 5 minutes and afterwards changes in peak forms and shifts were analyzed. The nature of liposome-protein interactions was estimated by several parameters: fluidity changes of hydrocarbon chains (shifts in CH₂ stretching mode bands at 2930-2850 cm⁻¹), changes of lipid carbonyl group hydration degree (contribution of highly hydrated lipids to the band interval 1719-1732 cm⁻¹), and changes of BSA structure (changes in α -helix/ β -sheet/ β -turn/random ratio for amid I during incubation and impact of aggregates in the absorption band intervals 1618-1627 cm⁻¹ and 1686-1696 cm⁻¹).

For ePC liposomes, incubation with BSA did not cause fluidity changes of hydrocarbon chains. Albumin associated with bilayer without embedding in it. Addition of 10% Mlph-DG into liposome composition produced some local surface defects which changed the interaction mode with BSA: as a result, fluidity of hydrocarbon chains increased. It is possible that albumin approaches closer to carbonyl (ester) lipid groups with its hydration shell resulting in hydration increase of these groups in 10 min, thereafter BSA interacts directly with carbonyl groups and embeds into bilayer. Addition of 10% PI into the ePC bilayer resulted in surface defects as well. It increased hydrocarbon chains fluidity after BSA addition. Percent of highly hydrated groups decreased after BSA addition because of electrostatic interactions between protein and lipids, although it recovered in the end of incubation to the initial level due to the following BSA molecules hydration shell. For BSA we observed decrease of α -helix quantity in its structure and enhancing aggregation during incubation. Presumably, BSA embeds into bilayer interacting with lipid carbonyl groups.

Though Mlph-DG and PI individually created defects in the bilayer, vice versa liposomes loaded with 10% Mlph-DG and 10 % PI together do not provoke protein embedding. Upon incubation with BSA we detected no shifts in CH₂ stretching mode bands. Hydration degree increased in 5 minutes that could be a result of BSA molecules hydration shell appearance nearby. Apparently, BSA changes its structure, aggregates and creates weak protein corona on the bilayer without embedding. We suppose that liposomes with both Mlph-DG and PI are protected due to "fixing"

electrostatic interactions between positively charged melphalan residue at pH 7.0 and PI phosphate group.

Our results are in agreement with previous study of the liposome integrity in serum media conducted by fluorescence methods [2].

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-04-01585).

References:

1. Kuznetsova N.R., Stepanova E.V., Peretolchina N.M., Khochenkov D.A., Boldyrev I.A., Bovin N.V., Vodovozova E.L. Targeting liposomes loaded with melphalan prodrug to tumour vasculature via the Sialyl Lewis X selectin ligand // J. Drug Target. 2014. Vol. 22. №3. P. 242–250.
2. Tretiakova D.S., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Mikhalyov I.I., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Evtushenko E.G., Vodovozova E.L. Influence of stabilizing components on the integrity of antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug in the bilayer // Coll. Surf. B Biointerf. 2018. Vol. 166. P. 45–53.

УДК 616-006.484: 577.27

ВЛИЯНИЕ АСТРОЦИТАРНЫХ АНТИГЕНОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Чехонин И.В.¹, Чернышева А.А.², Фоминова У.Н.¹, Черепанов С.А.¹, Кардашова К.Ш.¹, Гурина О.И.¹.

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава Российской Федерации
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23

²ФГБУ ВО «Воронежский государственный университет»
E-mail: Ivan-Chekhonin@yandex.ru

В исследовании продемонстрированы различия уровней продукции основных антигенов периглиомной зоны между экстрактами из клеток крысиной глиомы, астроцитов, кондиционированных клетками глиомы, нормальных астроцитов крысы. Показано различное влияние экстрактов из указанных клеток на зрелость фенотипа и иммуногенность крысиных дендритных клеток.

Ключевые слова: дендритные клетки, глиома, периглиомная зона, реактивные астроциты, нейроспецифические белки

В настоящей работе было изучено влияние состава астроцитарных клеточных экстрактов для сенсibilизации дендритных клеток на степень их иммуногенности. Проведено ко-культивирование крысиных астроцитов с клетками глиомы С6 (кондиционирование астроцитов клетками глиомы). Из кондиционированных (реактивных) астроцитов, а также из клеток глиомы С6 и нормальных крысиных астроцитов получены клеточные экстракты, которые отличались по уровню продукции антигенов периглиомной зоны, притом наибольшая продукция глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и коннексина-43 (Cx43) была выявлена в экстракте из кондиционированных глиомой астроцитов.

Указанные экстракты были использованы для сенсibilизации (пульсирования) крысиных дендритных клеток. Иммунофенотипическое исследование не выявило значимых различий между дендритными клетками, пульсированными антигенами экстрактов из клеток глиомы, астроцитов, реактивных астроцитов по ключевым маркерам зрелости CD86, CD83, однако выявило значимо меньшую экспозицию маркера CD11с дендритными клетками, пульсированными антигенами экстракта из реактивных астроцитов по сравнению с дендритными клетками, пульсированными антигенами экстрактов из клеток глиомы и астроцитов, что косвенно указывает на меньшую зрелость дендритных клеток, пульсированных антигенами реактивных астроцитов. В противоположность вышесказанному, исследование уровня интерлейкина-12 (ИЛ-12) в супернатантах культуральных сред выявило значимо больший уровень секреции данного цитокина дендритными клетками, пульсированными антигенами реактивных астроцитов по сравнению с дендритными клетками, пульсированными антигенами клеток глиомы С6, которые, в свою очередь, секретировали больше ИЛ-12, чем дендритные клетки, пульсированные антигенами нормальных астроцитов.

Иммуногенность дендритных клеток, пульсированных антигенами разных экстрактов, была изучена в эксперименте с их подкожным введением крысам. На фоне иммунизации дендритными клетками уровень интерферона-γ (ИФН-γ) в сыворотках крови крыс из разных групп стали отличаться, притом большая иммуногенность была показана в группе иммунизации антигенами клеток глиомы С6, где был отмечен уровень ИФН-γ больший, чем при иммунизации антигенами астроцитов или реактивных астроцитов. Меж-

ду двумя последними группами различий в сывороточном уровне ИФН- γ получено не было. При изучении продукции ИФН- γ моноклеарными клетками крыс, иммунизированных дендритными клетками, выявлена наименьшая продукция данного цитокина в группе иммунизации антигенами реактивных астроцитов. При вычислении уровней продукции моноклеарными клетками ИЛ-4, ИЛ-10, ИФН- γ выявлена прямая корреляция между уровнями ИЛ-4 и ИЛ-10 и обратная корреляция уровней ИЛ-4, ИЛ-10 с уровнем ИФН- γ . Таким образом, введение крысам пульсированных антигенами реактивных астроцитов дендритных клеток приводило к индукции менее выраженного провоспалительного ответа.

На основании полученных результатов следует заключить, что пульсирование дендритных клеток антигенами кондиционированных (реактивных) астроцитов приводило к меньшей иммуногенности дендритных клеток по сравнению с сенсibilизацией антигенами глиомы или аутологичных астроцитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках комплексного научного проекта №17-00-00162 (научный проект №17-00-00161).

УДК 616-006.484: 577.27

THE INFLUENCE OF ASTROCYTIC ANTIGENS ON DENDRITIC CELL IMMUNOGENICITY

I.V. Chekhonin¹, A.A. Chernysheva², U.N. Fominova¹, S.A. Cherepanov¹,
K.Sh. Kardashova¹, O.I. Gurina¹

¹V. P. Serbsky National Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Kropotkinskiy pereulok 23, Moscow 119034, Russian Federation

²Voronezh State University, Voronezh, Russia

e-mail: Ivan-Chekhonin@yandex.ru

In the research we have demonstrated differences in perigloma zone antigen production levels between extracts of rat glioma cells, glioma-conditioned astrocytes and normal rat astrocytes. We have also shown different influence of above mentioned cellular extracts on dendritic cell phenotype maturation and immunogenicity.

Key words: dendritic cells, glioma, perigloma zone, reactive astrocytes, neurospecific proteins

In the current work, we have studied the influence of different glial cellular extracts on the level of extract-pulsed dendritic cell immunogenicity. The experiment implied co-culturing of rat astrocytes with C6 glioma cells (astrocyte conditioning). Reactive conditioned astrocytes, C6 glioma cells, and normal rat astrocytes were used to derive cellular extracts which differed in perigloma zone antigen levels. When glial fibrillary acidic protein (GFAP) and connexin 43 (Cx43) concentrations in extracts were measured, it came out that reactive astrocytes produced a greater amount of these antigens in comparison with normal astrocytes or glioma cells.

Extracts obtained on previous step were used for pulsing of rat mononuclear cell-derived dendritic cells. Immunophenotype study did not detect any significant difference between CD83 and CD86 levels (major dendritic cell maturation markers) of reactive astrocyte, glioma, or astrocyte antigen-pulsed dendritic cells. Still, reactive astrocyte antigen-pulsed dendritic cells exposed significantly lower amount of CD11c when compared to glioma or astrocyte antigen-pulsed dendritic cells. This implied lower maturity of reactive astrocyte antigen-pulsed dendritic cells. In contrary to the latter fact, the study of interleukin 12 (IL-12) in culture medium supernatants revealed higher secretion of this cytokine by reactive astrocyte antigen-pulsed dendritic cells in comparison with glioma cell antigen-pulsed dendritic cells which in turn secreted more IL-12 than astrocyte antigen-pulsed dendritic cells.

Immunogenicity of different antigen-pulsed dendritic cells was further studied after subcutaneous administration to rats. During the process of rat immunization by dendritic cells, the serum levels of interferon- γ (IFN- γ) started to vary between groups. The most substantial immunogenicity was detected when glioma antigen-pulsed dendritic cells were administered leading to highest IFN- γ serum level. Reactive astrocyte and normal astrocyte antigen immunization groups did not show difference between each other. Then, levels of cytokine production by immunized rat-derived mononuclear cells were also measured. As far as IFN- γ is concerned, the lowest cytokine level was detected in group of immunization by reactive astrocyte antigens. Direct correlation was detected between IL-4 and IL-10 and inverse correlation was found between IL-4 and IFN- γ or IL-10 and IFN- γ . Thus, administration of reactive astrocyte antigen-pulsed dendritic cells to rats yielded induction of less prominent pro-inflammatory immune response.

On basis of the results obtained, we should conclude that pulsing of dendritic cells with antigens of glioma-

conditioned reactive astrocytes led to lower *in vivo* immunogenicity of those cells in comparison with ones pulsed by glioma or autologous astrocyte antigens.

The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) according to the complex research project №17-00-00162 (project №17-00-00161).

УДК 544.7, 577.112

ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОМЕМБРАН В КОМПЛЕКСЕ С МАГНИТНЫМИ НАНОСТЕРЖНЯМИ

Куценко Е.О., Ле-Дейген И.М., Усвалиев А.Д., Haney M.J., Batrakova E.V., Kabanov A.V., Головин Ю.И., Клячко Н.Л.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

119991 Ленинские горы, 1 стр 3

e-mail: kate.kutsenok@gmail.com

University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

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

В данной работе были изучены физико-химические свойства мембранных везикул (липосом, экзосом) в составе комплекса с магнитными наностержнями. При помощи методов флуоресцентной спектроскопии и явления форстеровского резонансного переноса энергии показана возможность разрыхления мембраны наночастицами под действием низкочастотного негреющего переменного магнитного поля. Продемонстрирована роль частоты и индукции магнитного поля в процессе разупорядочивания липидной мембраны: эффект усиливался с повышением обоих параметров. Полученный эффект разрыхления мембраны был достаточен для загрузки модельного лекарства доксорубина в везикулы.

Ключевые слова: липосомы, экзосомы, магнитные наностержни, FRET, флуоресцентная спектроскопия

В настоящее время одной из перспективных систем доставки лекарственных препаратов являются липосомы. Они обладают рядом преимуществ: биосовместимость, неиммуногенность, способность переносить как гидрофобные, так и гидрофильные вещества. Более сложной системой доставки лекарств являются экзосомы. Данные везикулы природного происхождения могут быть обнаружены практически во всех биологических жидкостях организмов. В силу более сложного строения, чем липосомы (наличия белковых компонентов, нуклеиновых кислот и проч.), использовать экзосомы в биомедицинских целях труднее.

Важной задачей является разработка систем доставки лекарственных препаратов с возможностью контролируемого высвобождения содержимого. Одним из решений данной проблемы могут стать комплексы мембранных везикул с магнитными наночастицами. Под действием негреющего низкочастотного переменного магнитного поля наночастицы, прикрепленные к поверхности везикул, могут колебаться, разрыхлять мембрану и способствовать ускоренному высвобождению содержимого. Целью работы стало изучение влияния параметров магнитного поля на мембрану липосом составом DPPC\CL 80\20 и экзосом, связанных в комплекс с магнитными наностержнями, покрытыми дофамином.

В настоящей работе нами было показано, что под действием магнитного поля наночастицы в комплексе с липосомами и экзосомами могут разрыхлять мембрану. Для этого была использована флуоресцентная метка на основе BODIPY. Аналитическим сигналом являлась поляризация флуоресценции, ее уменьшение свидетельствовало о снижении вязкости липидного бислоя. В качестве комплементарного метода анализа в везикулы вводили две флуоресцентные метки (BCHB-PC и TMB-PC), которые являлись FRET-парой. Известно, что при сближении этих двух меток флуоресценция TMB-PC тушится. Таким образом, снижение сигнала флуоресценции свидетельствовало о разрыхлении липидного бислоя. Нами было показано, что липосомальная и экзосомальная мембраны действительно разрыхляются под действием магнитного поля, причем данный эффект усиливается с повышением частоты и магнитной индукции поля. В случае липосом эффект носил линейный характер, а для экзосом данные описываются кривой с насыщением. Эффект разрыхления мембраны был достаточен для загрузки доксорубина в качестве модельной молекулы лекарственного вещества, о чем свидетельствует снижение сигнала флуоресценции препарата после воздействия магнитного поля.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 17-54-33027 и 18-29-09154.

UDC 544.7, 577.112

INFLUENCE OF MAGNETIC FIELD PARAMETERS ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF BIOMEMBRANES IN THE COMPLEXES WITH MAGNETIC NANORODS

Kutsenok E.O., Le-Deygen I.M., Usvaliev A.D., Haney M.J., Batrakova E.V., Kabanov A.V., Golovin Yu.I., Klyachko N.L.

Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia 119991, Leninskie gory, 1-3

e-mail: kate.kutsenok@gmail.com

University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599, USA

G.R. Derzhavin State University, Tambov, 392000, Russia

In this paper, physicochemical properties of membrane vesicles (liposomes, exosomes) in their complexes with magnetic nanorods were studied. Using fluorescence spectroscopy and the phenomenon of Forster resonance energy transfer (FRET) possibility of loosening the membrane by nanoparticles in low-frequency non-heating alternating magnetic field has been shown. The role of frequency and magnetic field induction in the process of lipid membrane disordering is demonstrated: the effect is enhanced with an increase of both parameters. The effect of membrane loosening was sufficient for loading of the model drug doxorubicin into vesicles.

Key words: liposomes, exosomes, magnetic nanorods, FRET, fluorescence spectroscopy.

Nowadays, liposomes are one of the promising drug delivery systems. Their advantages include biocompatibility, non-immunogenicity, transfer both hydrophobic and hydrophilic substances. More complex drug delivery systems are exosomes. These vesicles of natural origin could be found almost in all biological fluids. Due to more complex structure than liposomes (the presence of protein components, nucleic acids, etc.), it is more difficult to use exosomes for biomedical purposes.

It is essential to develop drug delivery systems with possibility of controlled release. One of the solutions could be complexes of membrane vesicles with magnetic nanoparticles. In non-heating low-frequency alternating magnetic field nanoparticles, attached to the surface of the vesicles, are able to oscillate, loosening the membrane and facilitating accelerated release of the content. The aim of the work was to study the influence of magnetic field parameters on the membrane of liposomes with the composition of DPPC \ CL 80 \ 20 and exosomes, which are complexed with magnetic nanorods coated with dopamine.

In this work, we have shown that complexed with liposomes and exosomes nanoparticles could induce loosening the membrane in magnetic field. Fluorescent studies were conducted utilizing BODIPY-based fluorescent label. The analytical signal was fluorescence polarization, its decrease evidenced about decrease in the viscosity of the lipid bilayer. As a complementary method of analysis, two fluorescent labels (BCHB-PC and TMB-PC), which was a FRET-pair, were introduced into the vesicles. It is known that when these two labels approach each other, the TMB-PC fluorescence is quenched. Thus, a decrease in the fluorescence signal can evidence about loosening of the lipid bilayer. Indeed, we have shown that the liposomal and exosomal membranes are loosened in magnetic field, and this effect increases with increasing of frequency and magnetic field induction. In case of liposomes, the effect was linear, and for exosomes data are described by a saturation curve. The effect of membrane loosening was sufficient to load doxorubicin as a model drug molecule, evidenced by a decrease in the fluorescence signal of the drug after exposure into magnetic field.

The work was supported by RFBR 17-54-33027 and 18-29-09154 grants.

УДК 578.5

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНОВОГО ОТВЕТА КЛЕТОК НА ОНКОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

Сосновцева А.О.^{1,2}, Липатова А.В.², Чумаков П.М.², Чехонин В.П.¹

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П.Сербского Минздрава России, 119034, Москва, Кропоткинский пер., д.23;

²ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул.Вавилова, д.32.

e-mail: aososnovtceva@gmail.com

В рамках данной работы было показано, что функционирование интерферонowego ответа является существенным препятствием к способности непатогенных энтеровирусов эффективно лизировать клетки и продуцировать вирусное потомство на высоком уровне, а блокирование возможности клеток отвечать на интерферон α/β , путем нокаута гена *Ifnar1*, приводит к существенному усилению онколитической активности энтеровирусов человека.

Ключевые слова: интерферон, онколитические вирусы, энтеровирусы, виротерапия

В нормальных клетках для защиты от вирусной инфекции существуют различные механизмы противовирусной защиты. Успешному заражению клетки вирусом, продукции в ней вирусного потомства и дальнейшему распространению инфекции препятствуют защитные системы клеток. В первую очередь это система распознавания вирусов с последующей индукцией секреции зараженной клеткой интерферона (IFN) первого типа, и сигнальные пути, обеспечивающие механизмы невосприимчивости клеток, проконтрактивировавших с IFN, к вирусам [1]. Большинство типов клеток способны синтезировать IFN- α/β в ответ на заражение вирусом, но некоторые вирусы способны уклоняться от интерферонowego ответа клеток хозяина [2]. Вакцинные штаммы вирусов не обладают патогенностью и их распространение в организме ограничено за счет индукции интерферона в ответ на заражение нормальных клеток, поскольку они не способны эффективно преодолевать интерфероновые механизмы.

Онкоселективность вирусов может обеспечиваться за счет различных генетических повреждений, приводящих к нарушениям механизмов неспецифической противовирусной защиты клеток [2,3], в частности за счет механизмов, включающих систему индукции IFN 1-го типа и систему приобретения устойчивости к вирусам клеток, вступивших в контакт с IFN [1,3]. Многие опухолевые клетки имеют различные дефекты в интерфероновой системе, характер этих повреждений разнообразен. Например, нарушения экспрессии интерферонowego рецептора или определенных звеньев сигнального пути JAK-STAT [3]; утрата экспрессии генов, регулируемых IFN и отвечающих за иммунную выбраковку, например, молекул главного комплекса гистосовместимости, белков TAP1, LMP2 и др. [4]. Таким образом, нарушения интерфероновых механизмов делают опухолевые клетки легкой мишенью для онколитической виротерапии [5].

Целью данной работы было изучение влияния системы интерферонowego ответа клеток на онколитическую активность непатогенных энтеровирусов человека на клетках глиомы С6 крысы с экзогенной продукцией рецепторов человека для энтеровирусов (полиовирусный рецептор, рецептор для Коксаки и аденовирусов).

Нами было показано, что заражение клеток вакцинными полиовирусами приводит к повышению уровня транскриптов INF- β . А предварительная обработка клеток интерфероном приводила к ограничению вирусной инфекции, вызванной вакцинными полиовирусами (Sabin, 1,2 и 3 тип) и непатогенными вирусами Коксаки B5 и A7. Таким образом было показано, что в клетках глиомы С6 механизмы противовирусного интерферонowego ответа находятся в относительно сохранном состоянии. Для определения влияния нарушения интерфероновых механизмов, с помощью технологии CRISPR-Cas9 были получены клетки с нокаутом гена субъединицы 1 интерферонowego рецептора *Ifnar1*. На данной линии было показано, что нокаут гена *Ifnar1* приводит к существенному усилению онколитической активности непатогенных энтеровирусов человека.

Таким образом, функционирование интерферонowego ответа является существенным препятствием к успешному цитолитическому действию вирусов на клетки и высокому уровню репродукции вирусов в клетках, а блокирование возможности клеток отвечать на интерферон α/β , путем нокаута гена *Ifnar1*, приводит к существенному усилению онколитической активности энтеровирусов человека.

Работа выполнена при поддержке Центра стратегического планирования Минздрава России (грант № 1.1096)

Литература:

1. Seth R. B., Sun L., Chen Z. J. Antiviral innate immunity pathways // *Cell research*. – 2006. – Т. 16. – №. 2. – С. 141.
2. Devasthanam A. S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses // *Virulence*. – 2014. – Т. 5. – №. 2. – С. 270-277.
3. Zitvogel L. et al. Type I interferons in anticancer immunity // *Nature Reviews Immunology*. – 2015. – Т. 15. – №. 7. – С. 405.
4. Seliger B., Maeurer M. J., Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth // *Immunology today*. – 2000. – Т. 21. – №. 9. – С. 455-464.
5. Kaufman H. L., Kohlhapp F. J., Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs // *Nature reviews Drug discovery*. – 2015. – Т. 14. – №. 9. – С. 642.

UDC 578.5

INFLUENCE OF THE CELLS INTERFERON RESPONSE SYSTEM ON THE ONCOLYTIC ACTIVITY OF NON-PATHOGENIC HUMAN ENTEROVIRUSES

Sosnovtseva A.O.^{1,2}, Lipatova A.V.², Chumakov P.M.², Chekhonin V.P.¹

¹Serbsky National Medical Research Center of Psychiatry and Addiction, Ministry of Health of Russia, 119034, Moscow, Kropotkinsky Ln., 23;

²Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, 119991, Moscow, Vavilova st, 32.
e-mail: aososnovtceva@gmail.com

It was shown that the functioning of the interferon response is a significant obstacle for effective cell lysis by non-pathogenic enteroviruses and for production of viral progeny. Blocking the ability of cells to respond to α/β interferon by *Ifnar1* gene knock-out leads to a significant increase of oncolytic enterovirus activity.

Key words: interferon, oncolytic viruses, enteroviruses, virotherapy

In normal cells there are various mechanisms of antiviral protection. Successful viral infection and efficient production of viral offspring, as like as further spread of the infection are hampered by protective systems of cell. There are virus recognition system with subsequent induction of the first type interferon (IFN) secretion and signaling pathways providing mechanisms for protection of cells contacted with IFN[1].

Most cells can synthesize IFN- α/β in response to viral infection, but some viruses can evade the interferon response of host cells [2]. Vaccine viral strains are non-pathogenic and their distribution in the organism is limited due to the induction of interferon in response in normal cells, since viruses are not able to overcome the interferon mechanisms effectively.

Oncoselectivity of viruses can be accounted for various genetic damages, leading to violations of nonspecific antiviral protection mechanisms of cell [2,3], e.g. first-type interferon-induction system and the interferon response system [1,3]. Many tumor cells have different defects in the interferon system, the nature of these damages varies (impaired expression of the interferon receptor or certain elements of the JAK-STAT signaling pathway [3], loss of IFN-regulated genes expression, e.g. genes, responsible for immune rejection, such as major histocompatibility complex molecules, TAP1, LMP2 proteins, etc. [4]). Thus, violations of interferon mechanisms make tumor cells an easy target for oncolytic virotherapy [7].

The aim of this work was to study the effect of the interferon response system on the oncolytic activity of non-pathogenic human enteroviruses on rat C6 glioma cells with exogenous production of human receptors for enteroviruses (poliovirus receptor, receptor for Coxsackie and adenoviruses).

We have shown that infection of cells with vaccine polioviruses leads to the increase of IFN- β transcription. At the same time, pretreatment of cells with interferon led to the inhibition of viral infection caused by vaccine polioviruses (Sabin, 1, 2 and 3 type) and non-pathogenic Coxsackievirus B5 and Coxsackievirus A7. Thus, it was shown that the mechanisms of the antiviral interferon response in C6 glioma cells are in relatively safe state. To determine the effect of impaired interferon mechanisms, cell line with knockout of interferon receptor subunit 1 gene (*Ifnar1*) using CRISPR-Cas9 system was obtained. It was shown that knockout of the *Ifnar1* gene leads to a significant increase in the oncolytic activity of non-pathogenic human enteroviruses.

Thus, interferon response functioning is a significant obstacle for successful cytolytic effect of viruses and high level of viral reproduction, for that reason blocking the ability of cells to respond to α/β interferon by knocking out the *Ifnar1* gene significantly enhances the oncolytic activity of human enteroviruses.

This work was supported by the Center for Strategic Planning of the Ministry of Health of Russia (Grant No. 1.1096)

References:

1. Seth R. B., Sun L., Chen Z. J. Antiviral innate immunity pathways //Cell research. – 2006. – Т. 16. – №. 2. – С. 141.
2. Devasthanam A. S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses //Virulence. – 2014. – Т. 5. – №. 2. – С. 270-277.
3. Zitvogel L. et al. Type I interferons in anticancer immunity //Nature Reviews Immunology. – 2015. – Т. 15. – №. 7. – С. 405.
4. Seliger B., Maeurer M. J., Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth //Immunology today. – 2000. – Т. 21. – №. 9. – С. 455-464.
5. Kaufman H. L., Kohlhapp F. J., Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs //Nature reviews Drug discovery. – 2015. – Т. 14. – №. 9. – С. 642.

УДК 57.024

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО УЛЬТРАЗВУКОВОГО СТРЕССА В ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ПОТОМСТВА КРЫС

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

Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского,
Москва, Россия
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
e-mail: abramova1128@gmail.com

Выявлено изменение концентрации трийодтиронина, тироксина и кортикостерона в плазме крови беременных крыс, подвергнутых хроническому стрессу во время беременности. Обнаружено снижение памяти у потомства стрессированных крыс.

Ключевые слова: стресс; память; трийодтиронин; тироксин; кортикостерон;

Стресс во время беременности может повлиять на развитие мозга эмбриона и привести к изменениям поведения потомства и его когнитивных способностей. Также известно, что стресс влияет на метаболизм тиреоидных гормонов [1]. Гормоны щитовидной железы матери необходимы для нормального развития мозга плода, а дисбаланс в их метаболизме может повлиять на когнитивные функции потомства [2]. Мы определили динамику тиреоидных гормонов и кортикостерона (КС) в плазме крови беременных крыс, а также исследовали когнитивные способности потомства этих крыс.

В эксперименте было задействовано 10 самок Sprague Dawley, которых разделили на две группы. Самки из экспериментальной группы (n = 5) после оплодотворения отсаживали в индивидуальные клетки и подвергали стрессу через хроническое воздействие ультразвука (УЗ) частотой 20-45 кГц на протяжении всего периода беременности. Самки из контрольной группы (n = 5) в период беременности содержались в стандартных условиях и не подвергались воздействию УЗ. После родов всех самок с потомством содержали в отдельных клетках в стандартных условиях. Для проведения иммуноферментного анализа у самок обеих групп производился забор крови из кончика хвоста в следующие временные точки: до беременности, на 8 и 16 дни беременности и на 3 день после родов. Измерялись концентрации трийодтиронина (T_3), тироксина (T_4) и КС с помощью ELISA KIT в соответствии с протоколом производителя. Полученное потомство от двух групп самок разлучалось с матерями в возрасте 1 месяца. Было получено четыре группы животных из потомства: две экспериментальные УЗ группы: самцы (n = 19) и самки (n = 16) и две контрольные группы: самцы (n = 8) и самки (n = 8). Потомство крыс тестировалось в тесте водный лабиринт Морриса в возрасте 2 месяцев для оценки пространственной памяти животных.

Результаты иммуноферментного анализа концентраций T_3 , T_4 и КС в плазме крови беременных самок из экспериментальной и контрольной групп представлены в таблице 1.

В тесте Морриса было обнаружено значительное снижение пространственной памяти у УЗ потомства по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Время нахождения платформы для УЗ потомства и контроля составило для самцов соответственно 60 (0;6,2) сек. и 28 (12;9) сек., для самок соответственно 60 (0;0,7) сек. и 38,5 (10;13) сек.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что стресс в пренатальный период у крыс отрицательно влияет на когнитивные функции потомства, а также изменяет гормональный статус беременных самок. Можно предположить, что нарушение памяти у потомства от УЗ самок произошло из-за дисбаланса тиреоидных гормонов под воздействием стресса у самок во время беременности.

Таблица 1. Концентрация T_3 , T_4 и КС в плазме крови беременных крыс.

Гормоны	Концентрация гормонов в плазме крови у контрольных беременных крыс n=5				Концентрация гормонов в плазме крови у крыс, подвергнутых УЗ стрессу во время беременности n=5			
	До беремен-ности	8 день беремен-ности	16 день беремен-ности	3 день после родов	До беремен-ности	8 день беремен-ности	16 день беремен-ности	3 день после родов
T_3 , нмоль/л	1,55±0,5	1,64±0,44	1,68±0,35	2,12±0,2	2,11±0,36	2,4±0,32	2,51±0,29	2,68±0,39
T_4 , нмоль/л	53,8±16,5	61,3±19,6	47,1±19,4	58,1±23,8	59,9±14,7	57,1±9,5	34,3±8,8	30,4±21,3
КС, нмоль/л	68,4±22,5	28,9±14,3	32,3±13,7	30,2±14,0	53,2±13,8	32,5±15,6	29,4±9,4	37,2±17,9

Литература:

- Надольник Л.И. Стресс и щитовидная железа // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, №. 4. – С. 443-456.
- Springer D., Jiskra J., Limanova Z., Zima T., Potlukova E. Thyroid in pregnancy: From physiology to Screening // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2017. Vol. 54. № 2. P. 102-116.

UDC 57.024

EFFECT OF THE PRENATAL CHRONIC ULTRASONIC STRESS ON COGNITION IN RAT OFFSPRING

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

Serbsky Federal Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia
119034, Moscow, Kropotkinskiy Ln., 23
e-mail: abramova1128@gmail.com

We found a change in the concentration of triiodothyronine, thyroxine, and corticosterone in the blood plasma of pregnant rats that were exposed to chronic stress during pregnancy. Memory decreased in the offspring of stressed rats.

Key words: stress; memory; triiodothyronine; thyroxine; corticosterone;

Stress during pregnancy affect the embryo brain development and lead to changes in the offspring's behavior and cognitive functions. Also, stress changes the metabolism of thyroid hormones [1]. At the same time, the maternal thyroid hormones are necessary for the normal fetal brain development. An imbalance in maternal thyroid hormones metabolism affects the cognitive functions of the offspring [2]. We determined the dynamics of thyroid hormones and corticosterone (CS) in the blood plasma of pregnant rats, and also we investigated the cognitive functions of the rat offspring.

The experiment involved 10 Sprague Dawley female rats, which were divided into two groups. The rats from the experimental group (n = 5) were kept in individual cages after fertilization and then they were stressed by chronic ultrasound (US) impact (20-45 kHz) during the entire pregnancy. The females from the control group (n = 5) during pregnancy were kept in standard conditions. After pregnancy, all rats with offspring were kept in individual cages and standard conditions. We took blood from rat tail tip for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at time points: before pregnancy, on days 8 and 16 of pregnancy, and 3 days after pregnancy. The concentrations of triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4) and CS were measured by an ELISA KIT according to protocol. Offspring separated from females at the age of 1 month. Four groups of animals from offspring were obtained: two experimental US groups: males (n = 19) and females (n = 16) and two control groups: males (n = 8) and females (n = 8). The rat offspring were tested by the water Morris maze test at the age of two months to evaluate the spatial memory.

The ELISA results of blood plasma T_3 , T_4 and CS concentrations in the experimental and control pregnant rats are presented in the Table 1.

Table 1. The blood plasma concentration of T3, T4 and CS in the pregnant rats.

Blood plasma hormones	Blood plasma hormone concentration in control pregnant rats n=5				Blood plasma hormone concentration in US pregnant rats n=5			
	before pregnancy	8 day of pregnancy	16 day of pregnancy	3 day after pregnancy	before pregnancy	8 day of pregnancy	16 day of pregnancy	3 day after pregnancy
T ₃ , nmol/l	1,55±0,5	1,64±0,44	1,68±0,35	2,12±0,2	2,11±0,36	2,4±0,32	2,51±0,29	2,68±0,39
T ₄ , nmol/l	53,8±16,5	61,3±19,6	47,1±19,4	58,1±23,8	59,9±14,7	57,1±9,5	34,3±8,8	30,4±21,3
CS, nmol/l	68,4±22,5	28,9±14,3	32,3±13,7	30,2±14,0	53,2±13,8	32,5±15,6	29,4±9,4	37,2±17,9

We found a significant spatial memory decrease in US offspring compared to control offspring in the water Morris maze test ($p < 0.01$). The location platform time for US offspring and control offspring was respectively 60 (0; 6.2) s. and 28 (12; 9) s. for males, and respectively (60 (0; 0.7) s. and 38.5 (10; 13) s. for females.

We concluded that stress during the prenatal period negatively affects the cognitive functions of the rat offspring, and also changes the hormonal status of the pregnant females. We assumed that the US offspring memory decrease was due to an imbalance of thyroid hormones by the prenatal stress.

References:

1. Nadolnik L.I. Stress and thyroid // *Biomedical chemistry*. – 2010. – V. 56, №4. – P. 443-456.
2. Springer D., Jiskra J., Limanova Z., Zima T., Potlukova E. Thyroid in pregnancy: From physiology to Screening // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2017. Vol. 54. № 2. P. 102-116.

УДК: 577.114.3, 547.455, ББК: 24.6

ДИЗАЙН НАНОЧАСТИЦ ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В-ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ФТОРХИНОЛОНОВ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ

А.А.Скuredина¹, Е.В.Кудряшова²

¹МГУ им. Ломоносова, Россия, 127273, Москва, Отрадная, 18,
e-mail: anna.skuredina@yandex.ru

²e-mail: helena.koudriachova@hotmail.com

В работе предложен подход создания олигомеров производных β-циклодекстринов с различными физико-химическими свойствами: структурой и поверхностным зарядом. Проведена оценка степени модификации торцов β-циклодекстрина сшивающим агентом гексаметилендиизоцианатом при синтезе наночастиц олигомеров. Методом ИК-спектроскопии Фурье получены константы диссоциации комплексов включения типа «гость-хозяин» синтезированных олигомеров с фторхинолонами. Показано улучшение связывания фторхинолонов более чем в 20 раз по сравнению с исходными производными β-циклодекстрина. Обнаружено замедление кинетики высвобождения фторхинолонов *in vitro*. Таким образом, синтезированные наночастицы представляются перспективными для создания формуляций антибактериальных препаратов с пролонгированным действием.

Ключевые слова: производные β-циклодекстрина, наночастицы, фторхинолоны

Несмотря на последние достижения медицины на сегодняшний день создание новых лекарственных препаратов является долгим и дорогостоящим процессом, вероятность успеха которого невысока. Для создания более эффективных формуляций с улучшенными фармакокинетическими характеристиками активно развивается область систем доставки лекарственных препаратов. Биосовместимые носители способствуют увеличению растворимости и биодоступности лекарства, и в тоже время снижению

дозировки, токсичности, иммуногенности, вероятности возникновения побочных эффектов. Кроме того, возможно придание системе специфических свойств, например, пролонгированного высвобождения лекарственного средства [1, 2].

Производные циклодекстринов активно используются в медицине, поскольку образуют комплексы включения типа «гость-хозяин» с большим количеством фармацевтических препаратов, содержащих гидрофобный фрагмент. Такие системы обладают рядом преимуществ по сравнению с другими системами доставки лекарственных препаратов, среди которых можно отметить дешевизну, доступность, разнообразие способов введения в организм. Последнее время в качестве лигандов используются полисахаридные и олигосахаридные носители на основе производных циклодекстринов. Дизайн полисахаридных лигандов и изучение их физико-химических свойств является перспективным для получения наиболее эффективной формуляции с улучшенными фармакокинетическими параметрами, а также создания систем с адресной доставкой [3,4].

Для создания высокоэффективной формуляции с пролонгированным действием в данной работе изучено влияние природы заместителя в производном β -циклодекстрина и мольного избытка сшивающего агента на физико-химические свойства синтезированных олигомеров на их основе, а также на физико-химические и фармакокинетические параметры антибактериальных препаратов группы фторхинолонов: левофлоксацина, моксифлоксацина и ципрофлоксацина.

В работе были получены наночастицы (100 – 200 нм) олигомеров на основе производных β -циклодекстрина с различной природой заместителя: 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин с полярным незаряженным заместителем, метил- β -циклодекстрин с неполярным заместителем и сульфобутиловый эфир β -циклодекстрина с полярным заряженным заместителем. Установлено, что в зависимости от природы заместителя в производном β -циклодекстрина комплексы фторхинолонов с полученными олигомерами характеризуются разной прочностью связывания (K_{dis} от 10^{-4} до 10^{-6}). Наиболее эффективное связывание наблюдается для олигомеров сульфобутилового эфира β -циклодекстрина: лиганд более чем в 20 раз превосходит исходный мономер по эффективности связывания (K_{dis} от 10^{-4} до 10^{-5}). Обнаружено, что преимущественно отрицательный заряд на поверхности частиц олигомеров сульфобутилового эфира β -циклодекстрина способствуют образованию более прочных комплексов за счет дополнительной стабилизации системы многоточечными ионными взаимодействиями между лигандом и положительно заряженным гетероциклом фторхинолонов. Показано, что в зависимости от природы исходного заместителя в производном β -циклодекстрина и мольном избытке сшивающего агента комплексообразование олигомеров с фторхинолонами приводит к контролируемому замедлению высвобождения лекарства.

Финансирование: Программа “УМНИК”.

Литература:

1. Dube D., Agrawal G.P., Vyas S.P. Tuberculosis: From molecular pathogenesis to effective drug carrier design // *Drug Discov. Today*. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 17, № 13–14. P. 760–773.
 2. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E. V. Drug delivery systems for fluoroquinolones: New prospects in tuberculosis treatment // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2017. Vol. 43, № 5. P. 487–501.
 3. Del Valle E.M.M. Cyclodextrins and their uses: A review // *Process Biochem.* 2004. Vol. 39, № 9. P. 1033–1046.
 4. Sherje A.P. et al. Cyclodextrin-based nanospices: A critical review // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2017. Vol. 173, № 1. P. 37–49.
- UDC: 577.114.3, 547.455

UDC: 577.114.3, 547.455

THE DESIGN OF OLIGOMERIC NANOPARTICLES BASED ON β -CYCLODEXTRIN DERIVATIVES TO CREATE THE DELIVERY SYSTEM WITH PROLONGED RELEASE FOR FLUOROQUINOLONE

A.Skuredina¹, E.Kudryashova²

¹Lomonosov Moscow State University, Russia, 123273, Moscow, Otradnaya, 18

e-mail: anna.skuredina@yandex.ru

²e-mail: helena_koudriachova@hotmail.com

In this paper the approach for creating oligomers based on β -cyclodextrin derivatives with different physical and chemical properties: structure and surface charge, is proposed. The degree of modification of the β -cyclodextrin torus by cross-linking agent hexamethylenediisocyanate in the synthesis of nanoparticle oligomers is estimated. The dissociation constants of the "guest-host" inclusion complexes of synthesized oligomers with fluoroquinolones were obtained by FTIR spectroscopy. The improvement of binding efficiency for fluoroquinolones in more than 20 times compared to the original derivative of β -cyclodextrin is observed. The deceleration of the fluoroquinolones release in vitro is observed. Thus, the synthesized nanoparticles seem promising for the creation of antibacterial drugs formulations with prolonged release.

Key words: β -cyclodextrin derivatives, nanoparticles, fluoroquinolones

Despite the latest advances in medicine, the creation of new drugs is still a long and expensive process with low probability of success. To create more effective formulations with improved pharmacokinetic characteristics, the drug delivery systems are actively developing. Biocompatible carriers contribute to an increase in the solubility and bioavailability of the drug, and at the same time reduce the dosage, toxicity, immunogenicity and the probability of side effects. Besides, it is possible to create the systems with specific properties, for example, prolonged release of the drug [1, 2].

Cyclodextrins derivatives are actively used in medicine, as they form "guest-host" inclusion complexes with a large number of pharmaceuticals containing a hydrophobic fragment. Such systems have a number of advantages in comparison with other drug delivery systems, among which the most important are the cheapness, availability, variety of ways of introduction into the body. Recently, polysaccharide and oligosaccharide carriers based on cyclodextrin derivatives have been used as ligands. The design of polysaccharide ligands and the study of their physical and chemical properties are promising for obtaining the most effective formulation with improved pharmacokinetic parameters, as well as the creation of systems with targeted delivery [3,4].

In this work the influence of the nature of the substituent in the β -cyclodextrin derivative and crosslinking agent molar excess on the physico-chemical properties of synthesized oligomers based on them, as well as on the physico-chemical and pharmacokinetic parameters of antibacterial drugs fluoroquinolones: levofloxacin, moxifloxacin and ciprofloxacin, are studied to create highly effective formulation with prolonged release.

In this work nanoparticles (100 – 200 nm) of oligomers based on β -cyclodextrin derivatives were obtained. β -cyclodextrin derivatives with different substituent nature were used: 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with polar uncharged substituent, methyl- β -cyclodextrin with nonpolar substituent and sulfobutyl ether β -cyclodextrin with polar charged substituent. It was found that depending on the nature of the substituent in the β -cyclodextrin derivative, fluoroquinolone complexes with obtained oligomers are characterized by different binding efficiency (K_{dis} is in the range of 10^{-4} - 10^{-6}). The most effective binding is observed for the oligomers based on sulfobutyl ether β -cyclodextrin: the ligand is more than in 20 times higher efficient in binding than the initial monomer (K_{dis} is in the range of 10^{-4} - 10^{-5}). It was found that the negative charge predominance on the surface of the particles contributes in the binding efficiency due to the additional stabilization of the system by multiple ion interactions between the ligand and the positively charged heterocycle in fluoroquinolones. It is shown that depending on the nature of the initial substituent in the β -cyclodextrin derivative and the molar excess of the crosslinking agent, the complexation of oligomers with fluoroquinolones leads to the controlled slowdown in the drug release.

Grant: Program "UMNIK".

References:

1. Dube D., Agrawal G.P., Vyas S.P. Tuberculosis: From molecular pathogenesis to effective drug carrier design // *Drug Discov. Today*. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 17, № 13–14. P. 760–773.
2. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E. V. Drug delivery systems for fluoroquinolones: New prospects in tuberculosis treatment // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2017. Vol. 43, № 5. P. 487–501.

3. Del Valle E.M.M. Cyclodextrins and their uses: A review // *Process Biochem.* 2004. Vol. 39, № 9. P. 1033–1046.
4. Sherje A.P. et al. Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2017. Vol. 173, № 1. P. 37–49.

УДК 576.311.349

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Макаров М.С.

ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы, Москва, Россия
129090, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3
e-mail: mcsimmc@yandex.ru

Исследовано влияние высоких концентраций аскорбиновой кислоты на морфофункциональные свойства тромбоцитов человека *in vitro*. Установлено, что высокие дозы аскорбиновой кислоты способны как подавлять, так и стимулировать активность тромбоцитов.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, тромбоциты, гранулы, ламелла, адгезия

Актуальность. Аскорбиновая кислота (АсК) широко используется в качестве антиоксиданта при неотложных состояниях, сопровождающихся системной воспалительной реакцией, нарушением работы сосудов, на фоне развития злокачественных опухолей. Установлено, что введение в кровь АсК снижает агрегационную активность тромбоцитов как *in vitro*, так и *in vivo*. С другой стороны, высокие концентрации АсК вызывают смещение редокс-потенциала среды в отрицательную область, при которой возможна спонтанная активация тромбоцитов. До сих пор не проводилось подробного морфофункционального анализа тромбоцитов при воздействии разных концентраций АсК.

Материалы и методы. В работе нами был использован оригинальный метод исследования витально окрашенных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии. АсК вводили в плазму с тромбоцитами до конечной концентрации 0,1 мМ, 0,3 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ и 5 мМ, затем пробы экспонировали при 37°C в течение 5-120 мин. В процессе исследования оценивали содержание тромбоцитов с гранулами, в % (структурно и функционально полноценные клетки), адгезивную активность тромбоцитов и формирование ими ламеллы при адгезии на стекле и коллагене 1-го типа, наличие и размер тромбоцитарных агрегатов.

Результаты. Концентрации АсК от 0,1 до 0,5 мМ не вызывали видимых изменений в структуре тромбоцитов и не влияли на их адгезивную активность. Однако если при 0,1-0,3 мМ АсК все тромбоциты с гранулами формировали ламеллу в процессе адгезии, то при 0,5 мМ АсК у 70% адгезирующих клеток ламелла вообще не формировалась, еще у 20% была слабовыраженной. В условиях 1-3 мМ АсК в течение 10-20 мин инкубации при 37°C отмечено образование в плазме мелких тромбоцитарных агрегатов диаметром до 10 мкм, которые затем дезагрегировали (распадались на отдельные клетки). В течение 30 мин экспозиции с 1 мМ АсК содержание тромбоцитов с гранулами снижалось на 20-30%, с 2-3 мМ АсК – на 30-50%. Дальнейшая экспозиция тромбоцитов с 1 мМ АсК снижения уровня тромбоцитов с гранулами не вызывала, тогда как при 2-3 мМ АсК тромбоциты продолжали дегранулировать и полностью теряли гранулы через 30-40 мин. При 5 мМ АсК уже через 10 мин тромбоциты образовывали многочисленные псевдоподии, характерные для стадии необратимой активации, не содержали гранул и не проявляли адгезивной активности. Таким образом, 2-5 мМ АсК вызывали спонтанную и необратимую активацию тромбоцитов, при 1 мМ АсК активация была частичной. С другой стороны, в присутствии 1 мМ АсК отмечен эффект стабилизации гранул в неактивированных тромбоцитах – такие клетки при нанесении на высоко адгезивный субстрат не образовывали тесных конгломератов и не формировали ламеллу, при этом даже через 2 часа экспозиции адгезирующие тромбоциты сохраняли часть гранул в своем составе. При адгезии на стекле сохранность общего объема гранул в тромбоцитах составила 86% через 1 час экспозиции и 74% через 2 часа; при адгезии на коллагене 1-го типа сохранность гранул составила 45% и 31% соответственно.

Выводы. Аскорбиновая кислота способна как подавлять, так и стимулировать активность тромбоцитов. При 0,5-1 мМ АсК наблюдается снижение адгезивной способности тромбоцитов на фоне сохранения их структурной целостности. При 2-5 мМ АсК происходит спонтанная и необратимая активация тромбоцитов. 1 мМ АсК позволяет частично стабилизировать тромбоцитарные гранулы при контакте тромбоцитов с адгезивным субстратом.

UDC 576.311.349

HIGH CONCENTRATION OF ASCORBIC ACID CHANGES HUMAN PLATELETS' MORPHOFUNCTIONAL RATE

Makarov M.S.

*N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow
129090, Moscow, B. Sukharevskaya pl., d.3
e-mail: mcsimmo@yandex.ru*

Human platelets' morphofunctional properties were studied after treatment with high concentration of ascorbic acid in vitro. Ascorbic acid could either stimulate and blockage platelet activity.

Key words: ascorbic acid, platelets, granules, lamella, adhesion

Introduction. Ascorbic acid (AsA) is widely used in emergency care treatment, especially at system inflammation, blood vessel disorders, malignancies. It was found, that AsA reduces platelet aggregation in vitro and in vivo. On the other hand, high doses of AsA turn plasma redox potential to negative values, that could induce spontaneous platelet activation. Morphofunctional analysis of human platelets in presence of high AsA concentrations was not still performed.

Material and methods. We used original morphofunctional method, based on cell vital staining and fluorescent microscopy. AsA was injected into platelet-rich plasma, gaining 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM и 5 mM concentration, then experimental samples were exposed at 37°C during 5-120 min. We studied level of platelets with granules, % (structurally and functionally full cells), platelet adhesion and lamella forming during contact with glass and 1-type collagen, formation and size of platelet aggregates.

Results. 0,1-0,5 mM of AsA did not cause visible changes in platelet structure and adhesion. Thus, at 0,1-0,3 mM AsA all platelets with granules formed lamella during adhesion, whereas at 0,5 mM AsA 70% of spread cells did not have lamella at all, 20% had poorly visible lamella. After 10-20 min incubation with 1-3 mM AsA one could note formation of small platelet aggregates 10 µm in diameter, platelet aggregates split into single cell during longer exposure. Later exposition with 1mM AsA did not change level of platelets with granules, whereas at 2-3 mM AsA platelets continued to lose their granules and became totally degranulated after 30-40 min. At 5 mM AsA platelets formed pseudopodia and degranulated even after 10 min incubation, these cells were irreversibly activated and did not have adhesion activity. So, 2-5 mM AsA caused spontaneous and total platelet activation, at 1mM AsA activation was particular. Nevertheless, 1 mM AsA could also stabilize platelet granules: in presence of 1 mM AsA platelets granules avoid intensive spreading and lamella forming at adhesively active substrate, after 2 hours of adhesion platelets kept part of granules. Platelet granules survival estimated 86% after 1 hour and 74% after 2 hours on glass, and 45% and 31% on collagen.

Conclusion. AsA had possibility either to stimulate and blockage platelet activity. 0,5-1 mM AsA reduced platelet adhesion, maintaining structural integrity. 2-5 mM caused spontaneous and total platelet activation. 1 mM AsA allows to stabilize part of platelet granules' volume during contact with adhesive substrate.

УДК 544.7, 577.112

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МАННОЗО-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИСАХАРИДОВ С КОНКАНАВАЛИНОМ А МЕТОДОМ ATR-FTIR СПЕКТРОСКОПИИ

Мамаева П.В., Ле-Дейген И.М., Скурдина А.А., Кудряшова Е.В.

*Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
119991 Ленинские горы, 1 стр 3
e-mail: pauline-mamaeva@mail.ru*

В настоящей работе предложено использование метода ATR-FTIR для детекции взаимодействия рецептора конканавалина А с маннозо-содержащими полисахаридами. Аналитической в ИК-спектре белка является полосы Амид II; связывание с маннозо-содержащим лигандом приводит к единообразному снижению интенсивности данной полосы с выходом на плато, что позволяет рассчитать физико-химические пара-

метры взаимодействия белок – лиганд по линейаризации полученных изотерм в координатах Скетчарда, и в дальнейшем может служить основой для экспрессного скрининга потенциальных систем доставки лекарств эффектом нацеливания на маннозные рецепторы клеток.

Ключевые слова: рецепторы, конканавалин А, хитозан, ATR-FTIR спектроскопия.

Актуальной задачей биомедицинской химии на сегодняшний день является синтез и характеристика биосовместимых полимеров переменной структуры с адресной меткой для создания систем активного нацеливания. Важным является изучение связывания таких полимеров с белками-рецепторами, однако в настоящее время спектр аналитических методов для данной цели ограничен. Для высокопроизводительного скрининга полимерных молекул с адресной меткой необходим быстрый и воспроизводимый метод изучения связывания с рецептором. Настоящая работа посвящена разработке метода изучения связывания маннозо-содержащих полимерных молекул с конканавалином А, который является модельным лектином при изучении связывания лигандов различного состава с маннозным рецептором. В качестве лигандов были исследованы маннозосодержащие образцы: галактоманнан, хитозан-манноза (5кДа, степень маннозилрования 35%) и хитозан-манноза (90кДа, степень маннозилрования 25%), а также D-манноза в качестве контроля. Структуры изученных лигандов приведены на рисунке 1. Разрабатываемый метод анализа основан на применении ИК-спектроскопии Фурье в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (ATR-FTIR).

В работе подобраны оптимальные условия регистрации ATR-FTIR-спектров конканавалина А, получены калибровочные зависимости интенсивности основных характеристических полос белка (Амид I, Амид II). Обнаружено, что связывание D-маннозы приводит к закономерному уменьшению интенсивности полосы Амид II. Помимо изменений в интенсивности пиков конканавалина А, при связывании с полимерными маннозо-содержащими лигандами наблюдаются изменения формы полос Амид I, Амид II что свидетельствует о влиянии комплексообразования на вторичную структуру белка.

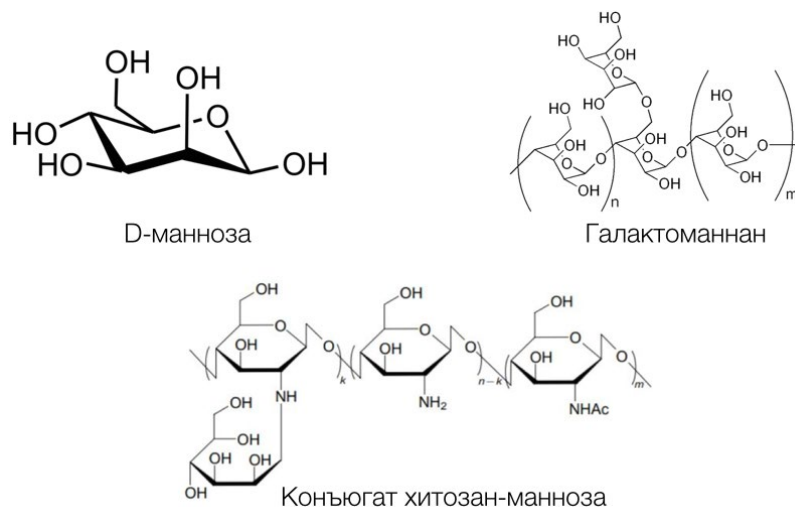


Рис.1. Структуры лигандов для связывания с конканавалином А: D-манноза, галактоманнан, конъюгаты хитозана с маннозой.

Линеаризация изотерм сорбции позволила рассчитать величины кажущихся констант связывания комплексов (таблица 1).

Таблица 1. Величины констант диссоциации комплекса конканавалина А с маннозо-содержащими полисахаридами в сравнение с D-Маннозой. 0,02 М PBS pH 7,4.
Концентрация конканавалина А 10 мг\мл, 22°C.

	D-Манноза	Галактоманнан	Хитозан-манноза (5 кДа)	Хитозан-манноза (90 кДа)
Kdis, M	$(3,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(5,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$

Установлено, что связывание с производными хитозана характеризуются наилучшими значениями K_{dis} , что указывает на перспективность дальнейшего применения производных хитозан-манноза для разработки систем доставки лекарственных препаратов, в том числе, в альвеолярные макрофаги легких, характеризующихся повышенной экспрессией рецепторов к маннозе. Продemonстрирована возможность применения метода ATR-FTIR для изучения комплексообразования рецептор – лиганд, что может быть применено для развития методов высокопроизводительного скрининга лекарственных формуляций *in silico*.

Работы выполнены при поддержке гранта РФФИ 18-33-00134.

UDC 544.7, 577.112

THE PROCESS OF COMPLEX FORMATION OF MANNOSE-CONTAINING POLYSACCHARIDES WITH CONCAVALINE A AS REVEALED BY BY ATR-FTIR SPECTROSCOPY METHOD

Mamaeva P.V., Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E.V.

Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia 119991 Leninskie gory, 1 3
 e-mail: pauline-mamaeva@mail.ru

In this paper ATR-FTIR spectroscopy method has been used for the detection of the interaction between concanavalin A receptor and mannose-containing polysaccharides. Amid II band in the IR spectrum of the protein has been suggested as analytical valuable; binding to the mannose-containing ligand leads to a uniform decrease in the intensity of this band with a plateau, which allows to calculate the physicochemical parameters of the protein-ligand interaction by linearizing the isotherms in the Scatchard coordinates and can later serves as a basis for rapid screening of potential drug delivery systems the effect of targeting the mannose cell receptors.

Key words: receptors, concanavalin A, chitosan, ATR-FTIR spectroscopy.

The actual task of biomedical chemistry today is the synthesis and characterization of biocompatible polymers of a variable structure with an address label for the active targeting drug delivery systems. One should study the binding of such polymers with receptor proteins, but at present the spectrum of analytical methods for this purpose is limited. High-throughput screening of targeted-label polymer molecules requires fast and reproducible method for studying receptor binding. This paper is devoted to the development of the study of the binding of mannose-containing oligomeric and polymeric molecules: D-mannose, galactomannan, chitosan-mannose (5kDa, degree of mannosylation, 35%) and chitosan-mannose (90kDa, degree of mannosylation, 25%) - with the receptor protein concanavalin A based on Fourier transform infrared spectroscopy in the mode of attenuated total reflection (ATR-FTIR). The structures of the studied ligands are shown on Figure 1.

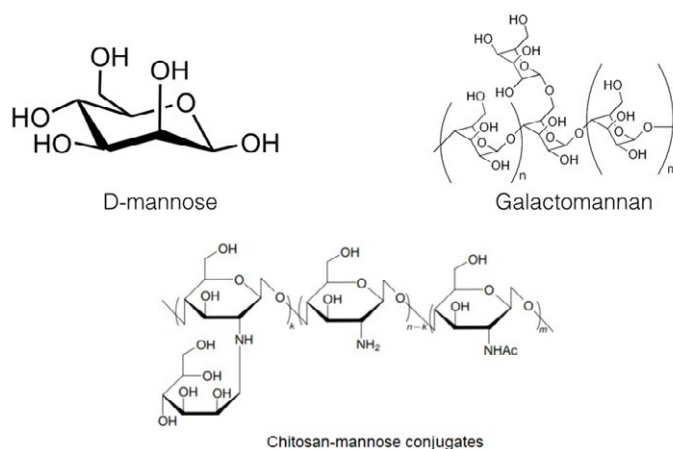


Fig. 1. Ligand structures for binding to concanavalin A: D-mannose, galactomannan, chitosan-mannose conjugates.

The optimal conditions for recording ATR-FTIR spectra of concanavalin A were selected, and calibration curves for the Amide I and II band were calculated. The binding of D-mannose was found to result in a regular decrease in the intensity of the Amide II band. In addition to changes in the intensity of peaks of concanavalin A, upon binding to polymeric mannose-containing ligands, changes in the shape of the Amide I and Amide II bands are observed, which indicates the effect of complexation on the secondary structure of the protein.

Table 1. The values of the dissociation constants of the complex of concanavalin A with mannose-containing polysaccharides. 0,02 M PBS pH 7,4. Concanavalin A concentration 10 mg/ml, 22°C.

	D-Mannose	Galactomannan	Chitosan - mannose (5 kDa)	Chitosan - mannose (90 kDa)
K _{dis} , M	$(3,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(5,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$

The linearization of sorption isotherms made it possible to calculate the values of the apparent binding constants of the complexes. Binding to chitosan derivatives has been found to be characterized by the best *K_{dis}* values (Table 1), indicating the promise of further use of chitosan-mannose derivatives for the development of drug delivery systems, including alveolar macrophages of the lungs, characterized by increased expression of mannose receptors. The possibility of the ATR-FTIR spectroscopy application to study the receptor-ligand complex formation has been demonstrated, which can be used to develop high-throughput screening methods for in-drug drug formulations.

The work was supported by the RFBR grant 18-33-00134.

УДК 577.322

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С ФИБРИНОГЕНОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ СВЕТОРАССЕЯНИЯ

Бурханов И.С., Кириченко М.Н., Чайков Л.Л., Булычев Н.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт Российской академии наук, Москва, Россия
119333, Москва, Ленинский проспект, д. 53
e-mail: inastroenie@gmail.com

С помощью методов светорассеяния исследовано взаимодействие наночастиц оксида железа, полученных в акустоплазменном разряде, с фибриногеном плазмы крови *in vitro*. Выяснено, что время хранения наночастиц влияет на их способность к взаимодействию с указанным белком, что проявляется в различной динамике гидродинамических радиусов образующихся агрегатов.

Ключевые слова: фибриноген, фибриновый гель, наночастицы оксида железа, акустоплазменный разряд

Исследование взаимодействия наночастиц оксидов железа с белками плазмы крови на сегодняшний день является актуальной задачей. Определяется это все возрастающим интересом к наночастицам в медицинской практике для лечения некоторых заболеваний, например, патологий гемостаза крови. В работе [1] показано, что для лечения гемофилии могут использоваться наночастицы оксида железа, поскольку они увеличивают стабильность рекомбинантного фактора VIIa (проконвертина).

Белок фибриноген и фермент тромбин являются участниками механизма гемостаза крови, в результате взаимодействия которых образуется фибриновый гель. В работе [2] нами показано, что инкубация фибриногена с наночастицами оксида железа, полученными в акустоплазменном разряде с кавитацией, приводит к невозможности взаимодействия тромбина с фибриногеном и реакция гелеобразования не идет.

Целью данной работы является исследование взаимодействий фибриногена с наночастицами оксида (используемых в день получения и через 5 суток после их получения) с помощью методов статического и динамического светорассеяния. Результаты. На стандартной установке по светорассеянию (с He-Ne лазером, 633 нм, коррелятором Photocor-Fcm и программой DynaLS) была получена динамика изменений распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц в растворе фибриногена

после добавления в него свежих наночастиц оксида железа (образец 1) и в растворе фибриногена с наночастицами, хранившимися 5 дней (образец 2). Выяснено, что после добавления свежих наночастиц в раствор фибриногена распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц изменяется существенным образом – появляется пик со средним размером 404,5 нм, а пик, соответствующий 14,4 нм (мономер фибриногена), пропадает. Полная интенсивность рассеянного света увеличивается на порядок, что свидетельствует об образовании агрегатов наночастиц с белком. При добавлении к раствору фибриногена наночастиц, срок хранения которых составлял 5 дней, распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц остаются практически неизменными (относительно распределения фибриногена без добавления наночастиц). Регистрируемая полная интенсивность светорассеяния также не увеличивается. При этом как в первом, так и во втором случае, дальнейшее добавление тромбина в образцы не приводит к образованию фибринового геля.

Таким образом, при взаимодействии фибриногена с наночастицами оксида железа происходит его инактивация вне зависимости от времени хранения наночастиц. Однако механизмы инактивации происходит по-разному: в первом случае, за счет агрегации фибриногена на поверхности наночастиц, а во втором, - за счет нарушения структуры фибриногена в области сайтов связывания их с тромбином без образования агрегатов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-32-00639\18.

Литература:

1. Shafir G, Galperin A, Margel S. Synthesis and characterization of recombinant factor VIIa- conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for hemophilia treatment//J. Biomed. Mater. Res. A. 2009. Vol. 91. № 4. P. 1056–1064.
2. Kirichenko M.N., Krivokhiza S.V., Chaikov L.L., Bulychev N.A. The influence of the sequence of nanoparticles injection to solution on the rate of fibrinogen-thrombin reaction//Journal of Physics: Conf. Series. 2017. Vol. 784, № 012025, P. 1-6.

UDC 577.322

STUDY OF THE MECHANISM OF INTERACTION OF IRON OXIDE NANOPARTICLES WITH BLOOD PLASMA FIBRINOGEN USING LIGHT SCATTERING

Burkhanov I.S., Kirichenko M.N., Chaikov L.L., Bulychev N.A.

*P.N. Lebedev physical institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
 119333, Moscow, Leninskii prospect, 53
 e-mail: inastroenie@gmail.com*

We studied the interaction of iron oxide nanoparticles, obtained in an acoustoplasma discharge, with plasma fibrinogen in vitro using light scattering methods. We found that the storage time of nanoparticles affects their ability to interact with this protein, which is manifested in different dynamics of the hydrodynamic radii of the resulting aggregates.

Key words: fibrinogen, fibrin gel, iron oxide nanoparticles, acoustoplasma discharge

The study of the interaction of iron oxide nanoparticles with blood plasma proteins is an urgent task today. This is determined by the ever-increasing interest in nanoparticles in medical practice for the treatment of certain diseases, for example, blood hemostasis pathologies. The work [1] shows that iron oxide nanoparticles can be used for the treatment of hemophilia since they increase the stability of recombinant factor VIIa (proconvertin).

The protein fibrinogen and the enzyme thrombin are participants in the hemostatic mechanism of blood; a fibrin gel is formed as a result of their interaction. In [2], we showed that the incubation of fibrinogen with iron oxide nanoparticles obtained in acoustoplasma discharge with cavitation leads to the impossibility of the interaction of thrombin with fibrinogen and the gelation reaction does not proceed.

The purpose of this work is to study the interactions of fibrinogen with oxide nanoparticles (used on the day of production and five days after their output) using the methods of static and dynamic light scattering.

We used the standard set up for light scattering (with He-Ne laser, 633 nm, the correlator Photocor-Fcm and the DynaLS program) for obtaining the dynamics of changes in the distributions of the scattered light intensity on particle sizes in the fibrinogen solution after adding fresh iron oxide nanoparticles (sample 1) and in a solution

of fibrinogen with nanoparticles stored for 5 days (sample 2). We found that after adding new nanoparticles to a solution of fibrinogen, the distribution of the intensity of scattered light by particle size changes significantly – a peak appears with an average size of 404.5 nm, and a peak corresponding to 14.4 nm (fibrinogen monomers) disappears. The total intensity of the scattered light increases by order of magnitude, which indicates the formation of aggregates of nanoparticles with protein. When we added nanoparticles that have been stored for 5 days to the fibrinogen solution, the distribution of scattered light intensity on particle size remains almost unchanged (relative to the fibrinogen distribution without adding nanoparticles). The recorded total intensity of light scattering also does not increase. Both in the first and in the second case, the further addition of thrombin to the samples does not lead to the formation of the fibrin gel.

Thus, fibrinogen is inactivated in its interaction with iron oxide nanoparticles, regardless of the storage time of the nanoparticles. However, inactivation mechanisms occur in different ways: in the first case, due to fibrinogen aggregation on the surface of nanoparticles, and in the second, due to disruption of fibrinogen structure in the region of their binding sites to thrombin without the formation of aggregates.

The research was supported by RFBR grant (project No. 18-32-00639\18).

References:

1. Shafir G, Galperin A, Margel S. Synthesis and characterization of recombinant factor VIIa- conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for hemophilia treatment//J. Biomed. Mater. Res. A. 2009. Vol. 91. № 4. P. 1056–1064.
2. Kirichenko M.N., Krivokhiza S.V., Chaikov L.L., Bulychev N.A. The influence of the sequence of nanoparticles injection to solution on the rate of fibrinogen-thrombin reaction//Journal of Physics: Conf. Series. 2017. Vol. 784, № 012025, P. 1-6.

УДК 541.64:547.551

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ PLGA НАНОЧАСТИЦ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ИНТРАВИТАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ

Мельников П.А.¹, Валихов М.П.¹, Малиновская Ю.А.^{2,3}

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П.Сербского" Минздрава России, 119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д.23

²ООО «Технология Лекарств», Московская область, Химки, ул. Рабочая, д 2а, 141400, Россия

³Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Ленинские Горы, д.1, Москва, 119991, Россия

e-mail: proximopm@gmail.com

Изучено распределение наночастиц в микрососудах мозга и их способность проникать через ГЭБ методом интравитальной микроскопии в режиме реального времени. Показано взаимодействие наночастиц с иммунокомпетентными клетками.

Ключевые слова: PLGA наночастицы, гематоэнцефалический барьер, интравитальная микроскопия

Одной из сложнейших проблем современной терапии нейроонкологических заболеваний является необходимость применения цитостатических препаратов, обладающих тяжелыми системными токсическими эффектами.

Заключение подобных терапевтических средств в наночастицы позволяет снизить их неспецифическое накопление в органах и тканях, и тем самым уменьшить токсическое воздействие (S.M. Moghimi et al, 2005). Применение различных наноконтейнерных систем существенно улучшает фармакокинетические параметры цитостатических агентов, позволяя существенно снижать разовые и курсовые дозы, а также увеличить биодоступность. Одной из перспективных моделей для таргетной терапии являются биodeградируемые PLGA наночастицы (на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот). (F. Danhier et al, 2012).

Проблема избирательной проницаемости ГЭБ также остается нерешенной. Для PLGA подобных наноконструкций описана способность к «пассивному таргетингу», то есть проникновению через поврежденный (L. Kou et al, 2017) ГЭБ за счет особенности конструкции и размера данных частиц (Gelperina et al., 2010; Wohlfart et al., 2011). Но до недавних пор методы визуализации ГЭБ отличались достаточно низкой точностью или требовали фиксации тканей. Интравитальная микроскопия (ИВМ) – новый подход, позволяю-

щий с высокой точностью определить локализацию наночастиц в различных тканях экспериментальных животных. Результаты таких исследований могут помочь повысить эффективность доставки наноконтейнерных препаратов.

Результаты. Разработан протокол интравитальной микроскопии коры головного мозга животных для инвертированной конфокальной лазерной сканирующей системы.

В данной работе была исследована способность прохождения PLGA наночастиц через ГЭБ экспериментальных животных методом ИВМ.

Продemonстрирована способность PLGA наночастиц к накоплению в клетках иммунной системы (нейтрофилах) в кровяном русле, которые предположительно могут переносить наночастицы через стенку кровеносных сосудов ГЭБ.

Литература:

1. Danhier F., Ansorena E., Silva J.M., Coco R., Le Breton A., Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*. 2012 Jul 20;161(2):505-22.
2. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010 Feb;74(2):157-63.
3. Wohlfart S., Gelperina S., Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release*. 2012 Jul 20;161(2):264-73. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.08.017. Epub 2011 Aug 18.
4. Kou L., Hou Y., Yao Q., Guo W., Wang G., Wang M., Fu Q., He Z., Ganapathy V., Sun J. L-Carnitine-conjugated nanoparticles to promote permeation across blood-brain barrier and to target glioma cells for drug delivery via the novel organic cation/carnitine transporter OCTN2. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018 Dec;46(8):1605-1616.

UDC: 541.64:547.551

INVESTIGATION OF PLGA NANOPARTICLE DISTRIBUTION INTO THE PARIETAL CORTEX USING INTRAVITAL IMAGING TECHNIQUE

Melnikov P.A.¹, Valikhov M.P.¹, Malinovskaya J.A.^{2,3}

¹V. Serbsky Federal Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health of the Russian Federation
119034 Kropotkinskii lane 23, Moscow, Russian Federation

²Drugs Technology LLC, Rabochaya st. 2A, 141400 Khimki, Moscow Region, Russian Federation

³Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation
e-mail: proximopm@gmail.com

Nanoparticle distribution within the cerebral cortex vasculature and their ability to cross BBB have been investigated using real-time intravital microscopy. NP interaction with immunocompetent cells have been determined.

Key words: PLGA nanoparticles, blood-brain barrier, intravital microscopy

Severe side effects related to systemic cytostatic administration is one of the main challenges of modern treatment of neuro-oncological diseases.

Loading of therapeutic agents into nanoparticles allow to reduce non-specific drug accumulation in organs and tissues, thus reducing side effects (S.M. Moghimi et al, 2005). Drug delivery by nanoparticulate carriers significantly improves the pharmacokinetic parameters of cytostatic agents, allowing to significantly reduce single and course doses, as well as increase bioavailability. Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles is one of the promising approaches for targeted therapy due to its biocompatibility, biodegradability and tunable drug release properties (F. Danhier et al, 2012).

One of the major obstacles for selective delivery of therapeutic agents into the CNS is the presence of BBB. As shown in previous studies PLGA NP coated with specific surfactants are able to considerably enhance brain delivery of several drugs after intravenous injection (Gelperina et al., 2010; Wohlfart et al., 2011) as well as passively accumulate at the tumour site due to EPR effect (passive targeting) (L. Kou et al, 2017).

Until recently, BBB visualization techniques were characterized by rather low accuracy or required tissue fixation. IVM is a powerful optical imaging technique that enables real-time investigation of biological processes at cellular and subcellular level in living animals. In particular it allows for the visualization of distribution of fluorescently-labeled nanoparticles within organs and tissues of experimental animals. The results of such studies can significantly improve the efficiency of nanoparticle-based drug delivery systems.

Results. We have developed and optimized a protocol for intravital microscopy of the cerebral cortex for an inverted confocal laser scanning system.

Distribution of fluorescently labeled PLGA NP in the living brain and their ability to penetrate across the BBB have been investigated.

The uptake of PLGA NP by immunocompetent cells (neutrophils) within the vasculature was determined, that can also contribute to NP BBB passage.

Moghimi S.M., Symonds P., Murray J.C., Hunter A.C., Debska G., Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. // *Mol Ther.* 2005 Jun;11(6):990-5.

References:

1. Danhier F., Ansorena E., Silva J.M., Coco R., Le Breton A., Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012 Jul 20;161(2):505-22.
2. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010 Feb;74(2):157-63.
3. Wohlfart S., Gelperina S., Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release.* 2012 Jul 20;161(2):264-73. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.08.017. Epub 2011 Aug 18.
4. Kou L., Hou Y., Yao Q., Guo W., Wang G., Wang M., Fu Q., He Z., Ganapathy V., Sun J. L-Carnitine-conjugated nanoparticles to promote permeation across blood-brain barrier and to target glioma cells for drug delivery via the novel organic cation/carnitine transporter OCTN2. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018 Dec;46(8):1605-1616.

УДК 57.013:612.1

ЛАЗЕРНАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ НОВЫХ АСПЕКТОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК

Самоделькин А.Г.¹, Дерюгина А.В.², Иващенко М.Н.¹, Белов А.А.¹, Гущин В.А.¹, Петров В.А.¹

Нижний Новгород, Россия

¹ ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ, 603107, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 97,
e mail: marina.31@rambler.ru.

² Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Изучалась возможность применения лазерной интерференционной микроскопии для качественной оценки морфологии и визуализации эритроцитов при воздействии низкоинтенсивного лазерного излучения. Установлено, что лазерная интерференционная микроскопия является важным инструментом, позволяющим визуализировать морфологию эритроцитов. Определены, новые аспекты воздействия лазерного излучения на функциональную морфологию клеток.

Ключевые слова: лазерная интерференционная микроскопия, эритроциты, низкоинтенсивное лазерное излучение.

Механизмы действия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) до сих пор остаются спорным вопросом, так как среди ученых нет пока единого мнения о том, чем объясняется эффективное действие лазерного излучения на организм человека и животного. Разработка методов эффективного воздействия НИЛИ возможна при исследовании действия лазерного излучения на уровне клеток и их мембран, которые являются конечным звеном действия экзогенных и эндогенных факторов. В качестве клеточной модели для исследований на мембранном уровне используются эритроциты, для которых установлена высокая корреляция между изменениями свойств их мембран и характеристиками гомеостаза клеток внутренних органов.

Новые перспективы в изучении клеточных процессов появились в связи с разработкой лазерной интерференционной микроскопии. Высокое пространственное разрешение, количественный характер получаемой информации и отсутствие необходимости применения красителей позволяет использовать этот метод в качестве универсального инструмента для исследования оптических и динамических свойств

живой клетки. Важная особенность интерференционной микроскопии заключается в том, что регистрируемая величина оптической разности хода лучей в интерферометре позволяет получать количественную информацию об объемном распределении показателя преломления объекта и его морфологии.

Целью наших исследований являлся анализ морфо-функционального состояния эритроцитов при воздействии НИЛИ с использованием лазерной интерференционной микроскопии. Исследование комплексной фазометрии эритроцитов проведено на микроскопе МИМ-340 (Екатеринбург, Россия). В работе исследовали действие НИЛИ в непрерывном режиме воздействия, облучение эритроцитов проводили *in vitro* с использованием автономного лазерного душа «МарсИК» (НПО «Петролазер», Санкт-Петербург) в течение 15 мин непрерывно.

Проведенное исследование показало, что эритроциты без воздействия НИЛИ имели типичную форму двояковогнутых дискоцитов, мембрана имела ровную поверхность, внутриклеточные структуры были равномерно распределены, соответственно, распределение гемоглобина и показателя преломления было равномерным. Фазовое изображение эритроцитов после действия НИЛИ сохраняло форму дискоцита, но имело не гладкую форму, а «шероховатую» с выростами и выпуклостями. Негладкая форма эритроцитов при действии НИЛИ, вероятно, связана с изменениями в структуре цитоскелета и перераспределением гемоглобина в цитоплазме и подмембранных областях. Таким образом, при схожести дискоидальной формы эритроцитов и их размеров без воздействия лазерного излучения, так и при действии НИЛИ, использование лазерной интерференционной микроскопии позволило выявить заметные отличия по фазовым изображениям в данных группах клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195.

UDC 57.013:612.1

LASER INTERFERENCE MICROSCOPY TO IDENTIFY NEW ASPECTS OF THE IMPACT OF LOW LEVEL LASER THERAPY ON FUNCTIONAL CELL MORPHOLOGY

Samodelkin A.G.¹, Deryugina A.V.², Ivashchenko M.N.¹, Belov A.A.¹, Guschin V.A.¹, Petrov V.A.¹

Nizhny Novgorod, Russia

¹ "Nizhny Novgorod state agricultural Academy" of the Ministry of agriculture, 603107, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 97. e-mail: marina.31@rambler.ru

² Institute of biology and Biomedicine Federal state Autonomous educational institution "National research Nizhny Novgorod state University Lobachevsky", 603950, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 23.

The possibility of using laser interference microscopy for the qualitative assessment of the morphology and visualization of erythrocytes when exposed to low level laser therapy was studied. It was found that laser interference microscopy is an important tool to visualize the morphology of red blood cells. New aspects of the effects of low level laser therapy on the functional morphology of cells have been identified.

Key words: laser interference microscopy, erythrocytes, low level laser therapy.

The mechanisms of action of low level laser therapy (LLLT) still remains a controversial issue, since among scientists there is still no consensus about what explains the effective effect of laser therapy on the human and animal body. Development of methods for effective influence of LLLT on the body possible in the study of the action of laser therapy on the level of cells and their membranes, which are the final link in the action of exogenous and endogenous factors. Erythrocytes are used as a cell model for studies at the membrane level, for which a high correlation has been established between changes in the properties of their membranes and the characteristics of the homeostasis of the cells of internal organs.

New perspectives in the study of cellular processes appeared in connection with the development of laser interference microscopy. The high spatial resolution, quantitative nature of the information obtained and the absence of the need for dyes allow using this method as a universal tool for the study of optical and dynamic properties of living cells. An important feature of interference microscopy is that the recorded value of the optical path difference in the interferometer allows to obtain quantitative information about the volume distribution of the refractive index of the object and its morphology.

The aim of our research was to analyze the morpho-functional state of erythrocytes under the influence of NILI

using laser interference microscopy. The study of complex fotometrii of erythrocytes was carried out on an MIM-340 microscope (Ekaterinburg, Russia). The work investigated the effect of LLLT in a continuous mode of exposure, erythrocyte irradiation was performed in vitro using the MarsIK autonomous laser shower (NPO Petrolaser, St. Petersburg) for 15 min continuously.

The study showed that the red blood cells without the influence of LLLT had a typical form of biconcave discocytes, the membrane had a flat surface, intracellular structures were evenly distributed, respectively, the distribution of hemoglobin and refractive index was uniform. The phase image of red blood cells after the action of LLLT retained the form of a discocyte, but had not a smooth form, but a «rough» one with outgrowths and bulges. The non-smooth form of erythrocytes under the action of LLLT is probably associated with changes in the structure of the cytoskeleton and the redistribution of hemoglobin in the cytoplasm and submembrane regions.

Thus, the similarity of the discoidal shape of red blood cells and their size without laser radiation, and under the action of the LLLT, the use of laser interference microscopy revealed significant differences in phase images in these groups of cells.

The research was done within the framework of Research № 18-016-00195 of Russian Foundation of Basic Research.

НАНОЗИМЫ “ИСКУССТВЕННАЯ ПЕРОКСИДАЗА” ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОАНАЛИЗА

М.А. Комкова, А.А. Карякин

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова
119991, Ленинские горы, 1/3, Москва, Россия
e-mail: aak@analyt.chem.msu.ru

Самому термину «нанозимы», пожалуй, немногим более 5-и лет. Интерес к нанозимам определяется возможностью моделировать каталитические пути природных ферментов, а также высокой стабильностью и ничтожной стоимостью неорганических наночастиц.

С целью моделирования активности природного фермента пероксидазы синтезированы наночастицы берлинской лазури (гексацианоферрата железа), лучшего электрокатализатора восстановления пероксида водорода, предложенного нами 25 лет назад. Разработанный метод каталитического синтеза позволил получить наночастицы, не только не уступающие, но и превосходящие по активности природный фермент; например, наночастицы диаметром 200 нм характеризуются каталитической константой скорости, в 300 более высокой, а наночастицы диаметром 570 нм опережают фермент на 4 порядка. В отличие от существующих нанозимов, имеющих пероксидазную активность, каталитически синтезированные наночастицы берлинской лазури характеризуются поистине ферментативными свойствами: ферментативной селективностью и способностью функционировать в физиологических растворах. Ультравысокая каталитическая активность и ферментативная селективность новых наночастиц наряду с высочайшей стабильностью и низкой стоимостью неорганических материалов, не содержащих благородных металлов, обеспечат их применение в биотехнологии и (био)химическом анализе вместо используемых в настоящее время дорогостоящих и недостаточно стабильных ферментов пероксидаз. Новые наночастицы берлинской лазури – единственные из нанозимов, которые могут найти применение в этой сфере медицинской диагностики.

Литература.

1. M.A. Komkova, E.E. Karyakina, A.A. Karyakin. Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase. *Journal of the American Chemical Society* 140 (2018) 11302.

NANOZYMES "ARTIFICIAL PEROXIDASE" FOR BIOTECHNOLOGY AND BIOANALYSIS

M.A. Komkova, A.A. Karyakin

Chemistry faculty of M.V. Lomonosov Moscow State University
119991, Lenin Hills, 1/3, Moscow, RUSSIA
e-mail: aak@analyt.chem.msu.ru

The term "nanozyme" is apparently 5 years old. An interest to nanozymes is provided by the possibility for modelling catalytic pathways peculiar to natural enzymes. In addition, inorganic nanoparticles are characterized by both high stability and negligible cost peculiar to inorganic nanoparticles.

In order to mimic natural enzyme peroxidase we synthesized nanoparticles of Prussian Blue (ferric hexacyanoferrate), the most advantageous electrocatalyst for hydrogen peroxide reduction, which has been discovered by us 25 years ago. The elaborated catalytic synthesis resulted in nanozymes with catalytic rate constants, which are significantly improved compared to natural enzyme peroxidase: for nanoparticles 200 nm in diameter, the turnover number is 300 times higher; for 570 nm diameter nanoparticles, it is 4 orders of magnitude higher. Comparing to the known peroxidase-like nanozymes with peroxidase-like activity, the advantages of the reported Prussian Blue nanoparticles are their true enzymatic properties: (1) enzymatic specificity (an absence of oxidase-like activity) and (2) an ability to operate in physiological solutions. The ultrahigh activity and enzymatic specificity of the catalytically synthesized Prussian Blue nanoparticles together with high stability and low cost, obviously peculiar to noble metal free inorganic materials, would allow the substitution of used nowadays natural and recombinant peroxidases, which are rather costly and not enough stable, in biotechnology and (bio)chemical analysis. We note that the synthesized Prussian Blue nanoparticles are the only nanozymes suitable for medical diagnostics.

References

1. M.A. Komkova, E.E. Karyakina, A.A. Karyakin. Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase. *Journal of the American Chemical Society* 140 (2018) 11302.

УДК 578.287

ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВАРИАНТОВ ШТАММА MOSCOW ВИРУСА СЕНДАЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В РАЗНЫХ СИСТЕМАХ РЕПЛИКАЦИИ

Зайнутдинов С. С., Романенко М. В., Кочнева Г. В.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово, Новосибирская область, Россия
e-mail: zaynutdinov_ss@vector.nsc.ru

При репликации штамма Moscow вируса Сендай в культурах клеток 4647 и 293 накапливаются адаптивные мутации, снижающие его онколитическую активность в отношении клеток меланомы и глиобластомы. Геновариант вируса, полученный в куриных эмбрионах, обладает наибольшей стабильностью и онколитической активностью.

Ключевые слова: вирус Сендай, онколитическая активность, адаптивные мутации

Вирус Сендай имеет природные противоопухолевые и иммуностимулирующие свойства за счёт повышенного сродства к клеткам многих видов опухолей. Он является лучшим природным индуктором интерферона, что также вносит вклад в его противоопухолевую активность [1]. Мы работаем с российским штаммом Moscow вируса Сендай [2], противоопухолевые свойства которого в 1990-х гг. тестировались на добровольцах со злокачественными заболеваниями 3 и 4 стадии, и у некоторых была длительная ремиссия [1]. Полногеномная последовательность этого штамма депонирована в базу данных GenBank под номером KP717417.1.

Высокочувствительной системой для репликации вируса Сендай является аллантоисная полость куриных эмбрионов. Мы показали, что у геноварианта штамма Moscow, прошедшего около 50 пассажей на куриных эмбрионах, стабильна первичная структура генома и сохраняется высокая онколитическая ак-

тивность *in vitro* в отношении клеток меланомы (Mel8) и глиобластомы человека (U87MG). Онколитическую активность измеряли в ХТТ-тесте путём расчёта 50%-й цитотоксической дозы, выраженной в числе вирионов на клетку.

Однако у препаратов, полученных в системе куриных эмбрионов, есть проблемы аллергенности и стандартизации. Их решением может быть адаптация вируса к культуре клеток. Мы использовали культуры 4647 (клетки почки африканской зелёной мартышки) и 293 (клетки почки эмбриона человека), аттестованные для производства вакцин в России. Оказалось, что при репродукции штамма Moscow в этих культурах клеток идёт быстрое (уже со 2 пассажа) накопление адаптивных мутаций, в основном в поверхностных белках вируса, что снижает его онколитические свойства. Геноварианты штамма Moscow, прошедшие более 20 пассажей на клетках 4647 и 293, отличались спектром мутаций между собой и от исходного геноварианта вируса [3].

Для проверки стабильности изменения онколитических свойств вируса и их связи с мутационной изменчивостью оба культуральных варианта были подвергнуты возвратному пассированию на куриных эмбрионах в течение 10 пассажей. Секвенирование их геномов показало, что мутации при адаптации к клеткам 4647 нестабильны и частично возвращаются к исходному варианту. Также происходит восстановление онколитических свойств вируса. Однако мутации, приобретаемые вирусом при адаптации к клеткам 293, не исчезают при возвратной репликации в куриных эмбрионах, и не происходит восстановления его онколитических свойств.

Таким образом, выбор системы репликации важен для сохранения структуры генома вируса Сендай и для реализации его онколитического потенциала. Также необходимо фиксировать структуру генома вируса с высокой противоопухолевой активностью путём клонирования его полногеномной последовательности генно-инженерными методами и последующего оживления в релевантной системе репликации. Клонированный геном штамма Moscow вируса Сендай далее можно использовать как основу для создания рекомбинантных вариантов вируса с улучшенными онколитическими свойствами за счёт встройки разных трансгенов.

Исследование поддержано РФФИ в рамках проекта № 18-34-00286 мол_а.

Литература:

1. Matveeva O. V., Guo Z. S., Senin V. M., Senina A. V., Shabalina S. A., Chumakov P. M. Oncolysis by paramyxoviruses: preclinical and clinical studies // *Molecular Therapy – Oncolytics*. – 2015. – Vol. 2, 150017. – doi:10.1038/mto.2015.17
2. Zainutdinov S. S., Tikunov A. Yu., Matveeva O. V., Netesov S. V., Kochneva G. V. Complete Genome Sequence of Sendai Virus Oncolytic Strain Moscow // *Genome Announcements*. – 2016. – Vol. 4. – No. 4. – e00818-16.
3. Зайнутдинов С. С., Гражданцева А. А., Кочетков Д. В., Чумаков П. М., Нетесов С. В., Матвеева О. В., Кочнева Г. В. Изменение онколитической активности вируса Сендай при адаптации к культурам клеток // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2017. – № 4. – С. 156–160.

UDC 578.287

ONCOLYTIC ACTIVITY OF GENOVARIENTS OF THE MOSCOW STRAIN OF SENDAI VIRUS, OBTAINED IN DIFFERENT REPLICATION SYSTEMS

Zainutdinov S.S., Romanenko M. V., Kochneva G. V.

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia
e-mail: zaynutdinov_ss@vector.nsc.ru

Replication of the Moscow strain of Sendai virus in cell cultures 4647 and 293 leads to the accumulation of adaptive mutations that reduce the oncolytic activity of the virus against melanoma and glioblastoma cells. The genovariant of the virus obtained in chicken embryos has the highest stability and oncolytic activity.

Key words: Sendai virus, oncolytic activity, adaptive mutations

Sendai virus has a natural anti-tumor and immunostimulating properties due to high affinity to the cells of many kinds of tumors. It is the best natural inducer of interferon, which also contributes to its antitumor activity [1]. We work with the Russian strain Moscow of Sendai virus [2], whose antitumor properties were tested on volunteers with stage 3 and 4 malignant diseases in the 1990s, and some of them had long-term remission [1]. The complete genome sequence of this strain is deposited in the GenBank database under the accession no. KP717417.1.

Highly sensitive system for the replication of Sendai virus is allantoic cavity of embryonated eggs. We have shown that the genovariant of the Moscow strain stably retains the primary structure of genome for 50 passages in chicken embryos and demonstrates high oncolytic activity against melanoma (Mel8) and glioblastoma (U87MG) human cells in vitro. Oncolytic activity was measured with XTT test by calculating the 50% cytotoxic dose, expressed in the number of virions per cell.

However, preparations obtained in the chicken embryo system have problems such as allergenicity and standardization. To solve these problems, the adaptation of the virus to cell culture could be used. We used cell cultures 4647 (African green monkey kidney cells) and 293 (human embryonic kidney cells), which are certified for vaccine production in Russia. It turned out that during the reproduction of the Moscow strain in these cell cultures, accumulation of adaptive mutations occurs quickly (already from 2nd passage), mainly in the surface proteins of the virus, which reduces its oncolytic properties.

The genovariants of the Moscow strain, which have passed more than 20 passages on the cells 4647 and 293, differed among themselves in the spectrum of adaptive mutations, as well as from the original gene variant of the virus [3].

To test the stability of changes in oncolytic properties of the virus and their relationship to the mutational variability, both cultural variants were subjected to a reverse passaging on chick embryos for ten passages. Sequencing of their genomes showed that the mutations during adaptation to 4647 cells are unstable and partly return to the original variant. And also restores the oncolytic properties of the virus. However, the mutations acquired by the virus during adaptation to 293 cells do not disappear during recurrent replication in chicken embryos, and the oncolytic properties are not restored.

Thus, the choice of a replication system is important for maintaining the genome structure of the Sendai virus and for realizing its oncolytic potential. There is a need to fix the structure of the genome of a virus with high antitumor activity by cloning its full-length genomic sequence using genetic engineering methods and subsequent virus rescue in the relevant replication system. The cloned genome of strain Moscow of Sendai virus can be further used as a basis for creation of recombinant variants of virus with improved oncolytic properties due to the insertion of various transgenes.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-00286 mol_a.

References:

1. Matveeva O. V., Guo Z. S., Senin V. M., Senina A. V., Shabalina S. A., Chumakov P. M. Oncolysis by paramyxoviruses: preclinical and clinical studies // *Molecular Therapy – Oncolytics*. – 2015. – Vol. 2, 150017. – doi:10.1038/mto.2015.17
2. Zainutdinov S. S., Tikunov A. Yu., Matveeva O. V., Netesov S. V., Kochneva G. V. Complete Genome Sequence of Sendai Virus Oncolytic Strain Moscow // *Genome Announcements*. – 2016. – Vol. 4. – No. 4. – e00818-16.
3. Zainutdinov S. S., Grazhdantseva A. A., Kochetkov D. V., Chumakov P. M., Netesov S. V., Matveeva O. V., Kochneva G. V. Change in oncolytic activity of Sendai virus during adaptation to cell cultures // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. – 2017. – Vol. 32. – No. 4, pp. 212–217.

УДК: 616.248, ББК: 52.7

ПОДАВЛЕНИЕ ГЕНА STAT3 ПРИ ПОМОЩИ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ РНК КАК ПОДХОД К ТЕРАПИИ НЕАЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

А.А.Никольский¹, И.П.Шиловский¹, С.М.Андреев¹, К.В.Кожихова¹, Е.Д.Барвинская¹, Л.И.Вишнякова¹, А.А.Бабахин¹, А.Р.Гайсина¹, М.Р.Хаитов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: aa.nikolskii@nrcii.ru

Был создан комплекс, состоящий из пептидного носителя b-LTP и миРНК против гена STAT3. Показано, что его аэрозольное введение снижает признаки воспаления в легких у мышей с экспериментальной нейтрофильной бронхиальной астмой.

Ключевые слова: нейтрофильная бронхиальная астма, миРНК, STAT3

Введение. Бронхиальная астма (БА) представляет собой гетерогенное, комплексное, хроническое воспалительное и обструктивное заболевание лёгких [1]. В патогенезе неаллергической БА большую роль

играют Th17-клетки, которые в свою очередь способствуют нейтрофильному воспалению дыхательных путей [2]. STAT3 имеет решающее значение для регуляции транскрипции Th17-клеток человека [3]. Поэтому целью данной работы было изучение биологической активности комплекса, состоящего из пептида-носителя b-LTP и молекул миРНК, направленных против гена STAT3 на модели нейтрофильной БА у мышей.

Материалы и методы. Мышей-самок линии BALB/c весом 20-22 г, в возрасте 6-8 недель разделили на 4 группы. Группы №1-3 трёхкратно с интервалом в 2 недели внутрибрюшинно сенсibilizировали смесью овальбумина (OVA) в дозе 20 мкг/мышь и адъюванта Фрейнда (FA) в дозе 100 мкл/мышь в объёме 0,2 мл мл/мышь. В дни 41-43 группам №1-3 ингаляционно (в течение 20 мин) вводили смесь OVA концентрацией 10 мг/мл и липополисахарида (LPS), полученного из *E.coli* концентрацией 400 мкг/мл. Группа №4 была интактным контролем. Группе №3 за 2 часа до ингаляции смесью OVA и LPS аэрозольно (20 минут) вводили комплекс siSTAT3/b-LTP (концентрацией 1,1 мг/мл) в массовом соотношении 1/12,5. Аналогично группе 2 вводился контрольный комплекс siGFP/b-LTP. На 44 день измеряли гиперреактивность бронхов (ГРБ) с помощью неинвазивной плетизмографии. Образцы крови были взяты для иммуноферментного анализа (ИФА) на определение аллерген-специфических антител IgE, IgG1 и IgG2a. На 45 день собирали бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) для дифференциального подсчёта лейкоцитов методом световой микроскопии. В клетках БАЛ, при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-time PCR), определяли экспрессию гена STAT3. С помощью гистологического анализа оценивали патологические изменения тканей легких.

Результаты. В 3 группе детектировали снижение экспрессии гена STAT3 на 20% по сравнению с мышами во 2 группе. Его снижение приводило к подавлению экспрессии генов IL-17F и IL-17A на 40% и 35% соответственно, по сравнению с животными во 2 группе. У групп с 1 по 3 был на 20% более высокий уровень ГРБ, и они имели большие уровни антител по сравнению с интактными мышами; при этом происходило увеличение уровня IgG2a на 40% в 3 группе по сравнению с группой 2. Анализ БАЛ показал выраженную инфильтрацию нейтрофилов в легкие мышей из групп 1 и 2 ($39\ 800 \pm 6\ 591$ и $81\ 832 \pm 5\ 330$ кл/мл, соответственно). У мышей 3 группы наблюдалось статистически значимое снижение уровня нейтрофилов в 3,2 раза (до $25\ 389 \pm 3\ 696$ кл/мл). В 4 группе количество нейтрофилов не превышало 1 000 кл/мл. Гистологический анализ тканей легких подтвердил эти данные.

Таким образом, ингаляционное введение комплекса, состоящего из пептидного носителя b-LTP и миРНК против гена STAT3, приводит к подавлению воспаления в легких, опосредованного нейтрофилами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-54-53089.

Литература:

1. Global Initiative for Asthma Global strategy for asthma management and prevention © 2014 // Global Initiative for Asthma. 2014. С. 148.
2. Newcomb D.C., Peebles R.S. Th17-mediated inflammation in asthma // *Current Opinion in Immunology*. 2013. Vol. 25, №6. P. 755–760.
3. Tripathi S.K. et al. Genome-wide analysis of STAT3-mediated transcription during early human Th17 cell differentiation // *Cell Reports*. 2017. № 9 (19). С. 1888–1901.

UDC: 616.248

SUPPRESSION OF STAT3 GENE BY RNA INTERFERENCE AS AN APPROACH TO THERAPY OF NONALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA

A.Nikolskii¹, I.Shilovskiy¹, S.Andreev¹, K.Kozhykhova¹, E.Barvinskaia¹, L.Vishniakova¹, A.Babakhin¹, A.Gaisina¹, M.Khaitov¹

¹National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24
e-mail: aa.nikolskii@nrcii.ru

The complex consisted of peptide carrier b-LTP and siRNA against STAT3 gene was developed. This complex reduces the features of inflammation in the lungs of mice with neutrophil bronchial asthma.

Key words: neutrophilic bronchial asthma, siRNA, STAT3

Introduction. Bronchial asthma (BA) is a heterogeneous, complex, chronic inflammatory and obstructive pulmonary disease [1]. In the pathogenesis of nonallergic BA, Th17 cells play an important role, which in turn

contribute to neutrophilic airway inflammation [2]. STAT3 is crucial for the regulation of the transcription of human Th17 cells [3]. Therefore, the purpose of this study was to assess the biological activity of the complex consisting of the carrier peptide b-LTP and siRNA molecules directed against the STAT3 gene on a model of neutrophilic BA in mice.

Materials and methods. Female BALB/c mice weighing 20-22 g, at the age of 6-8 weeks were divided into 4 groups. Groups 1–3 were triply intraperitoneally sensitized with 2 week intervals with a mixture of ovalbumin (OVA) at a dose of 20 µg/mouse and Freund's adjuvant (FA) at a dose of 100 µl/mouse in a volume of 0.2 ml/mouse. On days 41-43, groups №1-3 were inhaled (for 20 minutes) with the mixture of OVA at concentration of 10 mg/ml and lipopolysaccharide (LPS), obtained from *E. coli* at concentration of 400 µg/ml. Group 4 was intact control. Group №3, 2 hours before inhalation with the mixture of OVA and LPS, was nebulized with siSTAT3/b-LTP complex (at concentration 1.1 mg/ml). Similarly to group 2, the siGFP/b-LTP control complex was administered. On day 44, bronchial hyperreactivity (BHR) was measured using non-invasive plethysmography. Blood samples were taken for ELISA to assess the levels of allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a antibodies. On day 45, bronchoalveolar lavage (BAL) was collected for differential cell count by light microscopy. The expression of STAT3 gene in BAL cells Real-time PCR was used. Pathological changes of the lung tissues were assessed by histological analysis.

Results. In group 3, a decrease in STAT3 gene expression by 20% compared to mice in group 2 was detected. Its decrease led to the suppression of the expression of the IL-17F and IL-17A genes by 40% and 35%, respectively, compared to animals from group 2. Groups 1, 2, 3 demonstrated 20% higher level of BHR, and higher levels of IgE, IgG1 and IgG2a antibodies compared to intact mice; at the same time there was an increase in the level of IgG2a by 40% in the 3 group compared to 2. BAL analysis showed a pronounced infiltration of neutrophils into the lungs of groups 1 and 2 ($39,800 \pm 6,591$ and $81,832 \pm 5,330$ cells/ml, respectively). In mice of group 3 3.2-fold statistically significant decrease was observed (to $25,389 \pm 3,696$ cells/ml). In group 4, the number of neutrophils did not exceed 1,000 cells/ml. Histological analysis of lung tissue confirmed this data.

Inhalations of the complex consisted of peptide carrier b-LTP and siRNA against STAT3 gene leads to substantial decrease neutrophil mediated inflammation in the lungs. It could be a promising approach to treat neutrophilic asthma.

The study was supported by RFBR grant No16-54-53089.

References:

1. Global Initiative for Asthma Global strategy for asthma management and prevention © 2014 // Global Initiative for Asthma. 2014. С. 148.
2. Newcomb D.C., Peebles R.S. Th17-mediated inflammation in asthma // *Current Opinion in Immunology*. 2013. Vol. 25, №6. P. 755–760.
3. Tripathi S.K. et al. Genome-wide analysis of STAT3-mediated transcription during early human Th17 cell differentiation // *Cell Reports*. 2017. № 9 (19). С. 1888–1901.

УДК 57.024

ПРЕИМУЩЕСТВО УЛЬТРАЗВУКОВОЙ МОДЕЛИ ДЕПРЕССИИ ПО СРАВНЕНИЮ С КЛАССИЧЕСКОЙ МОДЕЛЬЮ ХРОНИЧЕСКОГО МЯГКОГО СТРЕССА

Зоркина Я.А., Зубков Е.А., Морозова А.Ю.

Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, Россия
 119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
 e-mail: zorkina.ya@serbsky.ru

Механизм развития депрессии, а также методы ее эффективного лечения до сих пор остаются загадкой. Решить эти задачи предстоит животным моделям, воспроизводящим аспекты депрессивного состояния у людей в современном обществе. В имеющихся моделях депрессии стрессорные воздействия не приводят к хронической информационной неопределенности, а именно она вызывает депрессивные нарушения у людей. Единственной такой моделью может являться наша оригинальная и простая модель, соответствующая всем необходимым критериям валидности. Её сравнение с наиболее часто используемой моделью, а также обзор исследований с ее применением продемонстрирован в данной работе.

Ключевые слова: хронический мягкий стресс; ультразвук, депрессия, животные модели

Модель Вильнера – хронический мягкий стресс является признанной в мире и наиболее часто используемой моделью депрессии. Однако она имеет ряд существенных недостатков, выражающиеся в неоднозначном протоколе моделирования, неполной воспроизводимости, трудности для экспериментатора, и самое главное в невозможности сопоставления стрессорных факторов, действующих на животных, с теми, что получает человек. В нашей лаборатории создан протокол, который не только позволяет с легкостью моделировать депрессивно-подобные состояния на лабораторных грызунах, но и является моделью чисто психологического стресса, которому ежедневно подвергаются и люди. Протокол предполагает 3-х недельное воздействие хронического информационного стресса, вызванного ультразвуковым (УЗ) воздействием переменной частоты.

Животные были разделены на следующие экспериментальные группы: контроль (n = 20); 3-недели УЗ-воздействия (n = 20); крысы, подвергнутые хроническому мягкому стрессу (n = 20). Протокол хронического мягкого стресса: Понедельник 10-00 – 18-00 лишение еды, Понедельник 18-00 – Вторник 10-00 включение/выключение света каждые 2 часа, Вторник 10-00 – 18-00 наклон клетки 45 градусов, Вторник 18-00 – Среда 10-00 лишение воды, Среда 10-00 – 18-00 стробоскоп в темноте, Среда 18-00 – Четверг 10-00 свет в ночное время; Четверг 10-00 – 18-00 лишение еды в мокрой клетке (вода в опилках по 250 мл в каждой клетке), Четверг 18-00 – Пятница 10-00 тесная клетка, Пятница 10-00 – 18-00 включение/выключение света каждые 2 часа, Пятница 18-00 – Воскресенье 10-00 новый партнер, Воскресенье 10-00 – 18-00 стробоскоп в темноте, Воскресенье 18-00 – Понедельник 10-00 свет в ночное время. После окончания воздействия проводились тесты на депрессивно-подобное поведение (тест на ангедонию, социальный интерес, принудительное плавание), а также тесты открытое поле и лабиринт Морриса.

При оценке поведения животных было отмечено, что депрессивно-подобные нарушения развиваются только у 70% крыс с использованием протокола хронического мягкого стресса, и у 100% крыс после УЗ-воздействия. В обеих моделях наблюдаются нарушения долговременной пространственной памяти в лабиринте Морриса (увеличение поиска платформы в 3,5 раза по сравнению с контролем), нарушения двигательной и исследовательской активности (в тесте открытое поле снизилось количество пересеченных квадратов и вертикальных стоек в 2,5 раза по сравнению с контролем). По критериям наличной и конструктивной валидности УЗ-модель депрессии обладает рядом преимуществ по сравнению с протоколом Вильнера, по критерию предсказательной валидности данные модели равны. Однако мы считаем, главным преимуществом ультразвуковой модели является однозначность используемого протокола и большую гомологию используемого типа стрессора в УЗ-модели депрессии.

UDK 57.024

ULTRASOUND MODEL OF DEPRESSION COMPARED WITH THE CLASSIC MODEL OF CHRONIC MILD STRESS

Zorkina YA, Zubkov EA, Morozova AY

Department of Basic and Applied Neurobiology V. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia.

119034, Moscow, Kropotkinsky Lane, 23

e-mail: zorkina.ya@serbsky.ru

Mechanism of development of depression, as well as methods of its effective treatment are still major concern. These problems will be solved using experimental animal models that reproduce aspects of a depressive state in people in modern society, but in the protocols of depression modeling, the effect of stress stimuli is not similar to that of the chronic information uncertainty, whereas it is the information uncertainty that causes depression in humans. In this paper we describe our original and simple model that meets the necessary validity criteria, it is compared to the most frequently used model.

Key words: chronic mild stress, ultrasound, depression, animal models

Willner's "chronic mild stress" (CMS) model is a globally recognized and most commonly used depression model. However, it has a number of significant defects, namely, the ambiguous modeling protocol, incomplete reproducibility, difficulties for the researcher, and, most importantly, the inability to compare stress factors affecting animals with those affecting humans. A protocol has been created in our laboratory that not only makes it easy to simulate depressive-like conditions on laboratory rodents, but is also based on the effect of purely psychological stress, which people are exposed to every day. The protocol assumes a 3-week exposure to chronic informational

stress caused by ultrasound (US) exposure to variable frequency.

The animals were divided into the following experimental groups: the group of control animals ($n = 20$); the group of rats that was exposed to ultrasonic radiation for three weeks ($n = 20$); and the group that was exposed to CMS protocol ($n = 20$). CMS protocol: Monday 10 a.m. – 6 p.m. food deprivation, Monday 6 p.m. – Tuesday 10 a.m. intermittent lighting (off/on every 2 h), Tuesday 10 a.m. – 6 p.m. 450 cage tilt, Tuesday 6 p.m. – Wednesday 10 a.m. water deprivation, Wednesday 10 a.m. – 6 p.m. stroboscopic illumination in the dark, Wednesday 6 p.m. – Thursday 10 a.m. light in the night; Thursday 10 a.m. – 6 p.m. Food deprivation in soiled cage (water in sawdust) (250 ml of water in each cage), Thursday 6 p.m. – Friday 10 a.m. mouse cage, Friday 10 a.m. – 6 p.m. intermittent lighting (off/on every 2 h), Friday 6 p.m. – Sunday 10 a.m. paired housing (new partner 6 month old), Sunday 10 a.m. – 6 p.m. stroboscopic illumination in the dark, Sunday 6 p.m. – Monday 10 a.m. light in the night. On the next day after CMS and US exposure tests for depressive-like behavior (sucrose preference, social interest, forced swim), open field and Morris water maze tests were performed.

When assessing animals' behavior, it was noted that depressive-like disorders develop only in 70% of rats with chronic mild stress and in 100% of rats after ultrasound exposure. In both models, there are disturbances of long-term spatial memory in the Morris maze (increased latency to find the platform by 3.5 times compared to the control), disruption of motor and research activity (in the open field test the number of crossed squares and vertical racks decreased by 2.5 times compared to the control). According to the face validity and construct validity criteria, the US depression model has a number of advantages over Willner's protocol; and according to the predictive validity criterion, these models are equal. However, we believe that the uniqueness of the protocol applied and the large homology of the type of stressor used in the US depression model of is its main advantage.

УДК: 57.036

РЕГУЛИРОВАНИЕ СКОРОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ И СТРУКТУРЫ ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С РАЗЛИЧНЫМ РН

М.Н.Кириченко¹, И.С.Бурханов¹, Л.Л.Чайков¹, Н.А.Булычев¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук (ФИАН), Россия, 119333, Москва, Ленинский проспект, 53,
e-mail: maslovamarina87@gmail.com

С помощью методов светорассеяния показано, что скорость образования фибринового геля увеличивается в 30 раз при предварительной инкубации тромбина с наночастицами, полученными в акустоплазменном разряде (рН 7,5). Инкубация тромбина с наночастицами с другой величиной рН (5,5) приводит к уменьшению скорости гелеобразования и изменению структуры геля.

Ключевые слова: Фибриноген, тромбин, фибриновый гель, наночастицы оксида железа, рН раствора

Исследование структуры и физико-химических свойств фибринового геля является актуальной задачей современной биомедицины. В организме человека фибриновый гель образуется в кровяном русле в результате ферментативной реакции расщепления белка – фибриногена ферментом – тромбином. Являясь структурным элементом тромбов, этот гель играет важную роль в гемостазе крови, нарушение стадий которого может приводить к различным патологиям крови (например, тромбозу и гемофилии). Использование наночастиц оксидов металлов для коррекции таких нарушений является перспективным биотехнологическим направлением. Кроме того, регуляция скоростей гелеобразования с помощью наночастиц может приводить к созданию биосовместимых гидрогелевых каркасов с заданными свойствами (например, структурой полимерной сети).

Для изучения динамики образования гелей и их структуры активно применяются методы светорассеяния. Авторы работы [1] показывают, что реакцию образования фибринового геля можно разделить на три стадии: 1) взаимодействие тромбина с фибриногеном (интенсивность светорассеяния не меняется); 2) агрегация молекул фибрина друг с другом с образованием протофибрил (сильный рост интенсивности); 3) дальнейшая агрегация протофибрил в образовании полимерной сети (интенсивность колеблется на одном уровне). Кроме того, переход золь/гель в системе фибриноген-тромбин отслеживают по изменению формы автокорреляционной функции (АКФ) интенсивности рассеянного света (появлению степенной компоненты) и уменьшению ее амплитуды [2].

Цель данной работы - с помощью методов светорассеяния исследовать скорость образования фибринового геля при введении в систему фибриноген-тромбин наночастиц оксида железа с различными величинами pH раствора.

Подготовка образцов. Наночастицы оксида железа были получены уникальным акустоплазменным методом с кавитацией, который сочетает в себе эффект упругих колебаний высокоинтенсивного ультразвука и импульсных или постоянных электрических полей в жидкой среде. Разряд инициируется в бидистиллированной воде между железными электродами с постоянным током 4 А и напряжением 40 В. Полученные наночастицы имеют неоднородную «рваную» поверхность и большое число центров адсорбции.

Фибриноген и тромбин (Sigma Aldrich) разводили в трис-HCl-буфере (7,2 pH) и растворе NaCl (0,9 М), соответственно. Конечная концентрация фибриногена в растворе составляла 3 мг/мл, конечная активность тромбина – 0,125 NIH ед./мл. Все измерения проводились при температуре 37°C.

Результаты. Временной ход интенсивности рассеянного света, полученный на стандартной установке по светорассеянию в образце фибриногена с тромбином, аппроксимируется s-образной кривой (логистическим уравнением) со скоростью нарастания величины интенсивности $V_{\text{без НЧ}}=22$ отн. ед./с. (стадия образования протофибрил). Инкубация наночастиц оксида железа (pH=7,5) с тромбином в течение 1 часа приводит к активации тромбина, которая выражается в существенном увеличении скорости нарастания величины интенсивности $V_{\text{НЧ pH7,5}}=633$ отн.ед./с. Причем все стадии образования фибринового геля протекают быстрее. При инкубации тромбина с теми же наночастицами, но с pH=5,5, происходит существенное замедление образования фибринового геля. На s-образной зависимости полной интенсивности светорассеяния от времени это отражается в существенном увеличении отрезка времени, соответствующего первой стадии, и замедлении скорости нарастания интенсивности на втором участке $V_{\text{НЧ pH5,5}}=12,5$ отн.ед./с. Различия в форме АКФ интенсивности при добавлении НЧ оксида железа с различными pH свидетельствует о том, что в образцах образуется гель с различной структурой. В случае НЧ с pH 7,5 гель более жесткий (в АКФ - степенная компонента), а в случае pH 5,5 более рыхлый с наличием жидкой фазы (в АКФ - растянутая функция Кольрауша).

Наночастицы оксида железа влияют на скорость образования фибринового геля, причем изменения pH раствора наночастиц открывает возможность регуляции скоростей его образования на различных этапах, что может быть важно с точки зрения медицины и инженерии тканей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-32-00639\18.

Литература:

1. Kita R., Takahashi A., Kaibara M. Formation of Fibrin Gel in Fibrinogen - Thrombin System: Static and Dynamic Light Scattering Study//*Biomacromolecules*. 2002. Vol. 3. P.1013–1020.
2. Martin J., Wilcoxon J. Critical dynamics of the sol-gel transition//*Phys. Rev. Lett.* 1988. Vol. 61. № 3. P.373–376.

UDC: 57.036

REGULATION OF THE RATE OF FORMATION AND STRUCTURE OF FIBRINE GEL USING IRON OXIDE NANOPARTICLES WITH DIFFERENT PH

M.Kitichenko¹, I.Burkhanov¹, L.Chaikov¹, N.Bulychev¹

¹P.N. Lebedev physical institute of the Russian academy of sciences, Russia, 119333, Moscow, Leninskii prospekt, 53
e-mail: maslovamarina87@gmail.com

Using light scattering methods, we showed that the rate of formation of a fibrin gel is increased 30-fold during the preliminary incubation of thrombin with nanoparticles obtained in an acoustoplasma discharge (pH 7.5). Incubation of thrombin with nanoparticles with different pH (5.5) leads to a decrease in the rate of gelation and a change in the structure of the gel.

Key words: Fibrinogen, thrombin, fibrin gel, iron oxide nanoparticles, solution pH

The study of the structure and physicochemical properties of fibrin gel is an essential task of modern biomedicine. In human bodies, fibrin gel is formed in the bloodstream as a result of the enzymatic reaction of the protein fibrinogen cleavage by the enzyme thrombin. Being a structural element of blood clots, this gel plays a vital role in hemostasis of the blood, violation of the stages of which can lead to various blood pathologies (for

example, thrombosis and hemophilia). The use of metal oxide nanoparticles for the correction of such violations is a promising biotechnological direction. Besides, the regulation of gelation rates using nanoparticles can lead to the creation of biocompatible hydrogel scaffolds with desired properties (for example, the structure of a polymer network).

Light scattering methods are actively used to study the dynamics of the formation of gels and their structure. The authors of [1] show that the reaction of the formation of a fibrin gel can be divided into three stages: 1) the interaction of thrombin with fibrinogen (the intensity of light scattering does not change); 2) aggregation of fibrin molecules with each other with the formation of protofibril (a sharp increase of the intensity); 3) further aggregation of protofibril with the formation of the polymer network (the intensity varies on the same level). In addition, the sol / gel transition in the fibrinogen-thrombin system is monitored by changing the shape of the autocorrelation function (ACF) of the intensity of scattered light (the appearance of a power-law component) and reducing its amplitude [2].

The purpose of this work is to investigate the rate of formation of fibrin gel using light scattering methods when introducing iron oxide nanoparticles with different pH values of a solution into the fibrinogen-thrombin system.

Sample preparation. Iron oxide nanoparticles were obtained by a unique acoustoplasma method with cavitation, which combines the effect of elastic vibrations of high-intensity ultrasound and pulsed or constant electric fields in a liquid medium. The discharge is initiated in bidistilled water between the iron electrodes with a constant current of 4 A and a voltage of 40 V. The resulting nanoparticles have a non-uniform "torn" surface and a large number of adsorption centers.

Fibrinogen and thrombin (Sigma Aldrich) were diluted in Tris-HCl buffer (pH 7.2) and NaCl solution (0.9 M), respectively. The final concentration of fibrinogen in the solution was 3 mg / ml, the final activity of thrombin was 0.125 NIH units / ml. All measurements were carried out at a temperature of 37 ° C.

Results. The temporal variation of the intensity of the scattered light, obtained by standard set up for light scattering in a sample of fibrinogen with thrombin, is approximated by an s-shaped curve (logistic equation) with an increased rate of intensity $V_{\text{without NP}} = 22 \text{ r.u./s}$. (stage of protofibril formation). Incubation of iron oxide nanoparticles (pH = 7.5) with thrombin for 1 hour leads to the activation of thrombin, which is expressed in a significant increase in the rate of growth of the intensity $V_{\text{with NP pH7.5}} = 633 \text{ r.u./s}$. All stages of the formation of fibrin gel flow faster.

When thrombin is incubated with the same nanoparticles, but with pH = 5.5, the formation of a fibrin gel slows down significantly. On the s-shaped dependence of the total intensity of light scattering on time, this is reflected in a significant increase in the length of time corresponding to the first stage and a slowdown in the rate of increase in intensity of the second stage $V_{\text{with NP pH5.5}} = 12.5 \text{ r.u./s}$. Differences in the form of ACF intensity with the addition of iron oxide nanoparticles with different pH indicate that a gel with a different structure is formed in the samples. In the case of NPs with a pH of 7.5, the gel is more rigid (in the ACF - the power component), and in the case of pH of 5.5, it is looser with the presence of a liquid phase (in the ACF - the extended Kolrausch function).

Iron oxide nanoparticles affect the rate of formation of a fibrin gel, and changes in the pH of the nanoparticles solution open up the possibility of regulating the rates of its formation at various stages, which may be important for medicine and tissue engineering.

The research was supported by RFBR grant (project No. 18-32-00639\18).

References:

1. Kita R., Takahashi A., Kaibara M. *Formation of Fibrin Gel in Fibrinogen - Thrombin System: Static and Dynamic Light Scattering Study*//*Biomacromolecules*. 2002. Vol. 3. P.1013–1020.
2. Martin J., Wilcoxon J. *Critical dynamics of the sol-gel transition*//*Phys. Rev. Lett*. 1988. Vol. 61. № 3. P.373–376.

УДК: 544.77

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕРАНОСТИКИ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА

А.С. Семкина^{1,2}, М.А. Абакумов^{1,2}, А.С. Скориков³, А.В. Иванова⁴, А.Г. Мажуга⁵, В.П. Чехонин¹

¹ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

² ФГАОУ НИТУ «МИСиС», Москва, Россия
119991, Москва, Ленинский пр-т, 4

³ ЕМАТ - Антверпенский университет, Антверпен, Бельгия
В-2020, Антверпен, Груненборгерлан 171

⁴ ФГБОУ ВО РТУ МИРЭА, Москва, Россия
119454, Москва, проспект Вернадского, дом 78

⁵ ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125047, Москва, Миусская площадь, д. 9

e-mail: alevtina.semkina@gmail.com

Получены магнитные наночастицы оксида железа, покрытые сывороточным альбумином, способные выступать в качестве химиопрепарата для терапии и в качестве контрастного агента для МРТ-диагностики опухолей мозга.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, оксид железа, тераностика, онкологические заболевания, глиома, химиотерапия, МРТ

Стремительный рост количества онкобольных в России и мире является причиной активного развития высокоэффективных методов ранней диагностики и направленной терапии этих заболеваний. Своевременное обнаружение злокачественного новообразования и его лечение с помощью новейших перспективных лекарственных препаратов являются залогом уменьшения смертности пациентов, именно поэтому в последнее время большое распространение получили лекарства-тераностика, которые наряду с терапевтической могут обладать и диагностической функцией.

Одними из наиболее привлекательных материалов-тераностиков являются магнитные наночастицы (МНЧ). Мы обратили свое внимание на наночастицы оксида железа, способные выступать в качестве контрастного агента при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ). Для стабилизации при физиологических условиях и снижения токсичности «голых» МНЧ проводилось их покрытие сывороточным альбумином (бычьим или человеческим). МНЧ-СА обладают гидродинамическим диаметром 36 ± 7 нм и дзета-потенциалом -30 ± 5 мВ, что обусловлено ионизацией карбоксильных групп в составе белка. Многочисленные эксперименты *in vitro* показали отсутствие цито- и генотоксических свойств у МНЧ-СА. Для МНЧ, покрытых человеческим сывороточным альбумином, был проведен весь комплекс доклинических исследований, в результате которых было установлено, что данный препарат не проявляет серьезной токсичности на организм животных и представляет собой эффективный контрастный агент для МРТ-диагностики мультиформной глиобластомы.

За счет наличия многочисленных функциональных групп на поверхности МНЧ-СА становится возможным проводить связывание наночастиц с флуоресцентными метками (для визуализации распределения МНЧ в живых клетках), с моноклональными антителами (для реализации адресной доставки МНЧ к патологическому очагу), с полиэтиленгликолем (для увеличения времени циркулирования в крови) и, конечно же, с лекарственным препаратом. Так, МНЧ-СА, конъюгированные с моноклональными антителами к фактору роста эндотелия сосудов VEGF, позволили провести визуализацию глиомы С6 у крыс с эффективностью, превышающей коммерческий контрастный препарат Feridex IV. В рамках создания терапевтического агента, МНЧ-СА были загружены химиопрепаратами Доксорубин и Цисплатин (20 и 30 масс.% соответственно). Подробное изучение механизма связывания препаратов с МНЧ позволило сделать вывод о возможном способе высвобождения цитостатиков из комплекса непосредственно в опухолевых клетках. Цитотоксический потенциал полученных комплексов был исследован в экспериментах *in vitro* на клетках глиомы С6 крысы и М6 мыши. С использованием конфокальной микроскопии было доказано проникновение наночастиц и лекарственного препарата в опухолевые клетки. Так же доказано более эффективная интернализация векторных МНЧ-СА, имеющих в своем составе специфические антитела. Таким образом, направленный транспорт цитостатиков с помощью МНЧ-СА может значительно снизить побочные эффекты традиционной химиотерапии опухолей мозга.

UDC: 544.77

MODERN THERANOSTIC AGENTS IN DIAGNOSTICS AND TREATMENT OF BRAIN TUMORS

A.S. Semkina^{1,2}, **M.A. Abakumov**^{1,2}, **A.S. Skorikov**³, **A.V. Ivanova**⁴, **A.G. Majouga**⁵, **V.P. Chekhonin**¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia
117997, Moscow, Ostrovitianov str. 1

² National Research Technological University "MISiS", Moscow, Russia
119049, Moscow, Leninskiy prospekt 4

³ EMAT – University of Antwerp, Antwerp, Belgium
B-2020, Antwerp, Groenenborgerlaan 171

⁴ Russian Technological University (MIREA), Moscow, Russia
119454, Moscow, Vernadsky Avenue 78

⁵ Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
125047, Moscow, Miusskaya sq., 9
e-mail: alevtina.semkina@gmail.com

Iron oxide magnetic nanoparticles coated with serum albumin were obtained. They can act as a chemotherapy drug for therapy and as a contrast agent for MRI diagnostics of brain tumors.

Key words: magnetic nanoparticles, iron oxide, theranostics, cancer, glioma, chemotherapy, MRI

Rapid growth in the number of cancer patients in Russia and the world is the reason for active development of highly effective methods for early diagnosis and targeted therapy of these diseases. Early detection of a malignant neoplasm and its treatment with newest promising drugs are the key to reduce patients mortality. That is why recently theranostic substances have become very common, because in addition to therapeutic, it can also have a diagnostic function.

Magnetic nanoparticles (MNP) are one of the most attractive theranostic materials. We turned our attention to iron oxide nanoparticles that can act as a contrast agent during magnetic resonance imaging (MRI). To stabilize under physiological conditions and to reduce the toxicity of "bare" MNP, they were coated by serum albumin (bovine or human). MNP-SA have a hydrodynamic diameter of 36 ± 7 nm and a zeta potential of (-30 ± 5) mV due to the ionization of carboxyl groups in the protein shell. Numerous in vitro experiments have shown the absence of cytotoxic and genotoxic properties of MNP-SA. For MNP coated with human serum albumin, the whole complex of preclinical studies was conducted. As a result it was found that this agent does not show serious toxicity on animal organism and is an effective contrast agent for MRI diagnostics of glioblastoma multiforme.

The presence of numerous functional groups on MNP-SA surface makes possible to carry out the binding of nanoparticles with fluorescent labels (to visualize MNP distribution in living cells), with monoclonal antibodies (to provide targeted delivery of MNP to pathological area) with polyethylene glycol (to increase blood circulation time) and, of course, with the drug. So, MNP-SA conjugated with monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor VEGF allowed to visualize C6 glioma in rats with efficiency higher than the commercial contrast agent Feridex IV. For therapeutic agent creation, MNP-SA were loaded with chemotherapy drugs Doxorubicin and Cisplatin (20 and 30 wt.%, respectively). Detailed study of the mechanism of binding drugs with MNP led to the conclusion about a possible ways of cytostatics release from the complex directly into tumor cells. The cytotoxic potential of obtained complexes was investigated during in vitro experiments on C6 rat and M6 mouse glioma cells. Using confocal microscopy, the penetration of nanoparticles and the drug into tumor cells has been proven. A more efficient internalization of targeted MNP-SA, which contains specific antibodies, is also proved. Thus, cytostatics targeted transport with the help of MNP-SA can significantly reduce the side effects of traditional chemotherapy of brain tumors.

УДК 576.08

СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ ОБЪЕКТОВ НАНОМЕТРОВОГО РАЗМЕРА МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Кононова И.В.¹, Мамаева С.Н.², Павлов А.Н.², Гольдерова А.С.², Кириллина М.П.^{1,2}, Афанасьева Л.Н.³,
Никифоров П.В.³

¹ ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», г. Якутск, Россия,
e-mail: irinakon.07@mail.ru

² ФГАОУ ВО «Северо-Восточный Федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Россия

³ ГБУ РС(Я) «Якутский республиканский онкологический диспансер», г. Якутск, Россия

Разработан и применен простой в исполнении, недорогой способ подготовки капиллярной и венозной крови человека для визуализации нанометровых объектов методом растровой электронной микроскопии.

Ключевые слова: растровая электронная микроскопия, наноразмерные объекты, кровь, эритроциты.

Визуализация стала одним из основных инструментов фундаментальных биомедицинских исследований. Растровая (сканирующая) электронная микроскопия предоставляет возможность получать изображения объектов нанометровых размеров. К тому же, использование низкого напряжения в современных растровых электронных микроскопах (РЭМ) теперь не требует нанесения на биологические образцы (БО) какого-либо искусственного покрытия. Ранее покрытия использовались для защиты БО от повреждающего воздействия физических факторов РЭМ. Однако такие покрытия мешали увидеть детальную текстуру поверхности БО.

Мы предположили, что с помощью РЭМ и без нанесения покрытия на БО появится возможность визуализировать биологические объекты нанометрового размера. При этом мы хотели соблюсти важное для нас условие – минимизировать химическое и физическое воздействие на БО для его подготовки к микроскопии на РЭМ, то есть сохранить образец интактным (хотя бы относительно).

В работу были взяты образцы крови от двух разных женщин (47 лет и 50 лет), которые не имели в момент проведения эксперимента обострения хронических заболеваний и находились в привычном для них состоянии физической и интеллектуальной активности. От каждой женщины были получены образцы капиллярной и венозной крови. То есть, всего в эксперименте было четыре образца. Изображения крови получили с помощью растрового электронного микроскопа JSM-7800F (JEOL Ltd, JAPAN) при низком напряжении (1kV) под увеличениями от 500 до 40.000 крат, фокусное расстояние - 4,0 мм.

Оптимальными образцами для получения РЭМ-изображений образцов капиллярной крови, на которых четко видны светлые объекты нанометровых размеров (от 30 нм до 100 нм) как на поверхности эритроцитов, так и в пространстве между ними, явились мазки капиллярной крови из места укола пальца, приготовленные на предметных стеклах унифицированным способом и высушенные на воздухе при температуре 20-22 градуса по Цельсию.

Оптимальным для получения РЭМ-изображений образцов венозной крови, на которых также визуализируются наноразмерные объекты, был признан способ, при котором венозная кровь собиралась в пробирки с ЭДТА. При этом мазок венозной крови должен готовиться сразу после забора крови, приготовлен также на предметном стекле унифицированным способом и высушен на воздухе при температуре 20-22 градуса по Цельсию.

Представленный в этой работе недорогой и простой в исполнении способ подготовки капиллярной и венозной крови человека позволяет визуализировать нанометровые объекты методом растровой электронной микроскопии.

UDC 576.08

PREPARATION OF HUMAN BLOOD SAMPLES FOR OBTAINING A NANOMETER-SIZED OBJECTS IMAGE BY ELECTRON MICROSCOPY

Kononova I.V.¹, Mamaeva S.N.², Pavlov A.N.², Golderova A.S.², Kirillina M.P.^{1,2}, Afanasyeva L.N.³, Nikiforov P.V.³

¹ FGBNU «Yakut Science Center of complex medical problem», Yakutsk, Russia,
e-mail: irinakon.07@mail.ru

² FGAOU VO «North-Eastern Federal University named after M. K. Ammosov», Yakutsk, Russia

³ GBU «Yakutian Republican Oncology Center», Yakutsk, Russia

A simple, inexpensive, method of preparing human capillary and venous blood for the visualization of nanometer objects using scanning electron microscopy was developed and applied.

Key words: scanning electron microscopy, nanoscale objects, blood, red blood cells.

Visualization has become one of the main tools of basic biomedical research. Scanning electron microscopy provides the ability to obtain images of nanometer-sized objects. In addition, the use of low voltage in modern scanning electron microscopes (SEM) does not require application of any artificial coating on biological samples (BO) now. Previously, coatings were used to protect BO from the damaging SEM's physical factors effects. However, such coatings made it difficult to see the detailed texture of the BO surface.

We assumed that without coating the BO, it would be possible to visualize biological objects of nanometer size by SEM. At the same time, we wanted to meet an important condition for us - to minimize chemical and physical effects on the BO.

Blood samples were taken from two different women (47 years and 50 years old) who had no exacerbation of chronic diseases at the time of the experiment and were in their usual state of physical and intellectual activity. Capillary and venous blood samples were obtained from each woman. That is, there were only four samples in the experiment. Images of blood were obtained using a JSM-7800F scanning electron microscope (JEOL Ltd, JAPAN) at low voltage (1kV) under magnifications from 500 to 40.000 times, working distance 4.0 mm.

Optimal solution for obtaining SEM images of capillary blood samples, on which bright nanometer-sized objects (from 30 nm to 100 nm) are clearly visible both on the surface of erythrocytes and in the space between them, was capillary blood smears prepared from glass slides in a unified way and dried in air at a temperature of 20-22 degrees Celsius.

The method by which venous blood was collected in tubes with EDTA was considered optimal for obtaining SEM images of venous blood samples, on which nanoscale objects are also visualized. In this case, a smear of venous blood should be prepared immediately after blood collection, also prepared on a glass slide in a unified way and dried in air at a temperature of 20-22 degrees Celsius.

The inexpensive and easy-to-perform method of preparing human capillary and venous blood presented in this work allows visualizing nanometer-sized objects using scanning electron microscopy.

УДК 576.536

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОБКЛАДОЧНЫХ КЛЕТОК КРЫС И ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ХРОНИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА

Воронова А.Д.^{1,2}, Степанова О.В.¹, Валихов М.П.¹, Чадин А.В.¹, Семкина А.С.², Абакумов М.А.², Решетов И.В.³, Чехонин В.П.^{1,2}

¹Отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ НМИЦПН им. В.П.Сербского Минздрава РФ, Москва;

²Кафедра медицинских нанобиотехнологий медико-биологического факультета РНИМУ им. Н.И.Пирогова, Москва, РФ;

³Университетская клиническая больница №1 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, РФ

По разработанным нами протоколам были получены культуры обкладочных клеток из обонятельной выстилки человека и крыс. В данной работе была изучена эффективность трансплантации данных

клеток при разных типах хронического повреждения. Методом МРТ было показано, что через 4 недели после повреждения у некоторых крыс в спинном мозге образуются кисты, тогда как у других животных кисты не формируются. При трансплантации обкладочных клеток человека и крыс в посттравматические кисты спинного мозга было показано улучшение подвижности задних конечностей крыс и был обнаружен нейропротективный эффект данных клеток. При этом терапевтический эффект обкладочных клеток человека был более выраженным. Терапевтический эффект от трансплантации клеток в область повреждения спинного мозга без сформированных кист не выявлен.

Ключевые слова: обкладочные клетки обонятельной выстилки крыс, обкладочные клетки обонятельной выстилки человека, обонятельная выстилка, клеточная терапия, кисты спинного мозга, травма спинного мозга

Лечение травматических повреждений спинного мозга является важнейшей проблемой современной нейробиологии и нейрохирургии. Приблизительно у 25-30% пациентов в результате травм в спинном мозге образуются кисты, которые сдавливают спинной мозг, препятствуя регенерации нервной ткани (1). Существующие хирургические и медикаментозные методы лечения не позволяют в полной мере добиться выздоровления пациентов (2). Одним из перспективных направлений в этой области является клеточная терапия. Значительные эффекты на регенерацию спинного мозга в экспериментальных моделях и в ряде клинических испытаний показали обкладочные клетки обонятельной выстилки носа. Однако использование данных клеток практически не изучено при терапии посттравматических кист спинного мозга. Целью данного исследования было изучение и сравнение терапевтического эффекта обкладочных клеток крыс и человека на подвижность задних конечностей при разных типах хронического повреждения спинного мозга. По разработанным нами протоколам были получены культуры обкладочных клеток из обонятельной выстилки человека и крыс (3). Данные клетки были охарактеризованы по одновременной экспрессии маркеров γ -NTR и GFAP. Оценка терапевтического эффекта трансплантации обкладочных клеток проводилась на модели, разработанной в нашей лаборатории. Методом МРТ было показано, что через 4 недели после повреждения у некоторых крыс в спинном мозге образуются кисты, тогда как у других животных кисты не формируются. Обкладочные клетки человека и крыс (0,75 и 1,5 миллиона) были трансплантированы в посттравматические кисты крыс, а также в спинной мозг животных, у которых через 4 недели не формировались кисты. Динамику восстановления двигательной активности задних конечностей крыс оценивали с использованием теста BBB (4) через 2, 3 и 4 недели после трансплантации клеток. Было показано улучшение подвижности задних конечностей крыс после трансплантации обкладочных клеток человека и крыс в посттравматические кисты, а также был обнаружен нейропротекторный эффект данных клеток. При этом терапевтический эффект обкладочных клеток человека был более выраженным. Терапевтический эффект от трансплантации обкладочных клеток человека и крыс в область повреждения спинного мозга без формирования кист не выявлен. В данном исследовании было обнаружено, что эффективно трансплантировать клетки в полностью сформированные кисты. Положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс, выявленная в нашей работе, может свидетельствовать о регенеративных процессах в спинном мозге после трансплантации обкладочных клеток в область посттравматических кист. Для дальнейших клинических исследований необходимо создание аутологичного, тканеспецифичного клеточного препарата обкладочных клеток обонятельной выстилки. Его последующее комбинированное применение с хирургическими и медикаментозными методами позволит существенно улучшить качество жизни пациентов травматическими повреждениями спинного мозга.

Литература:

1. Bonfield CM, Levi AD, Arnold PM, et. al. Surgical management of post-traumatic syringomyelia. *Spine*. Oct.2010;35(21S):S245-258.
2. Schaan M, Jaksche H. Comparison of different operative modalities in post-traumatic syringomyelia: preliminary report. *Eur Spine J*. 2001 Apr;10(2):135-40.
3. Воронова А.Д., Степанова О.В., Валихов М.П., Чадин А.В., Дворников А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П. Получение препарата обкладочных клеток из обонятельной выстилки человека для лечения травм спинного мозга. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, 2017.-N 4.-С.207-212.
4. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.

UDC 576.536

COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF TRANSPLANTATION OF RAT AND HUMAN OLFACTORY ENSHEATHING CELLS WITH DIFFERENT TYPES OF CHRONIC DAMAGE OF SPINAL CORD

Voronova A.D.^{1,2}, Stepanova O.V.¹, Valihov M.P.¹, Chadin A.V.¹, Semkina A.S.^{1,2}, Abakumov M.A.², Reshetov I.V.³, Chekhonin V.P.^{1,2}

¹Department of Fundamental and Applied Neurobiology, NIITSPN V.P. Serbsky of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow;

²The Department of Medical Nanobiotechnology of the Faculty of Medicine and Biology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

³University Clinical Hospital №1 of the Sechenov University, Moscow, Russia

According to the protocols developed by us, cultures of olfactory ensheathing cells from the olfactory mucosa of humans and rats were obtained. In this research, the effectiveness of the transplantation of these cells in different types of chronic damage was studied. By MRI, it was shown that 4 weeks after the injury, some rats have cysts in the spinal cord, while in other animals no cysts are formed. During transplantation of cells and rats in post-traumatic cysts of the spinal cord, an improvement in mobility of the hind limbs of rats was found, and the neuroprotective effect of these cells was found. In this case, the therapeutic effect of olfactory ensheathing cells of human was more pronounced. The therapeutic effect of cell transplantation in the area of spinal cord injury without cysts was not detected.

Key words: olfactory ensheathing cells of rats, olfactory ensheathing cells of human, olfactory mucosa, cell therapy, cysts of spinal cord, spinal cord injury

The treatment of traumatic injuries of the spinal cord is the most important problem of modern neuroscience and neurosurgery. Approximately 25-30% of patients as a result of injuries in the spinal cord form cysts that squeeze the spinal cord, preventing the regeneration of nervous tissue (1). Existing surgical and medical methods of treatment do not allow for the full recovery of patients (2). One of the promising directions in this area is cellular therapy. Olfactory ensheathing cells of the olfactory mucosa of the nose showed significant effects on the regeneration of the spinal cord in experimental models and in a number of clinical trials. However, the use of these cells has not been practically studied in the treatment of posttraumatic cysts of the spinal cord. The purpose of this study was to study and compare the therapeutic effect of the olfactory ensheathing cells of rats and humans on the mobility of the hind limbs with different types of chronic spinal cord injury. According to the protocols developed by us, cultures of olfactory ensheathing cells from the olfactory mucosa of humans and rats were obtained. These cells were characterized by the markers p75NTR and GFAP. The evaluation of the therapeutic effect of transplantation of olfactory ensheathing cells was carried out on a model developed in our laboratory (3). By MRI, it was shown that 4 weeks after the injury, some rats form cysts in the spinal cord, whereas in other animals, cysts do not form. Olfactory ensheathing cells of humans and rats (0.75 and 1.5 million) were transplanted into post-traumatic cysts of rats, as well as into the spinal cord of animals that did not form cysts after 4 weeks. The dynamics of the restoration of the motor activity of the hind limbs of rats were evaluated using the BBB test (4) after 2, 3 and 4 weeks after cell transplantation. An improvement in the mobility of the hind limbs of rats after the transplantation of the olfactory ensheathing cells of human and rats into post-traumatic cysts was shown, and the neuroprotective effect of these cells was found. At the same time, the therapeutic effect of the olfactory ensheathing cells of humans was more pronounced. The therapeutic effect of the transplantation of the olfactory ensheathing cells of humans and rats in the area of spinal cord injury without the formation of cysts was not identified. In this study, it was found to effectively transplant cells into fully formed cysts. The positive dynamics of the recovery of motor activity of the hind limbs of rats, as identified in our work, may indicate regenerative processes in the spinal cord after the transplantation of the olfactory ensheathing cells into the region of post-traumatic cysts. For further clinical studies, it is necessary to create an autologous, tissue-specific cell preparation of the olfactory ensheathing cells of the olfactory mucosa. Its subsequent combined use with surgical and medical methods will significantly improve the quality of life of patients with traumatic injuries of the spinal cord.

References:

1. Bonfield CM, Levi AD, Arnold PM, et. al. Surgical management of post-traumatic syringomyelia. *Spine*. Oct.2010;35(21S):S245-258.

2. Schaan M, Jaksche H. Comparison of different operative modalities in post-traumatic syringomyelia: preliminary report. *Eur Spine J.* 2001 Apr;10(2):135-40.
3. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., Chadin A.V., Dvornikov A.S., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. Obtaining of the preparation of lining cells from the human olfactory ensheathing cells for treatment of spinal cord injuries. *Cell technologies in biology and medicine*, 2017.-N 4.-C.207-212.
4. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12(1):1-21.

УДК 577.325.6

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА CBS-ПИРОФОСФАТАЗЫ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЙЯНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПОСОБОВ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЭТОГО ФЕРМЕНТА

Е.Ю. Сошинская, И.Д. Дельцов, Л.А. Дадинова

Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия
119333, Москва, Ленинский проспект, д. 59
e-mail: katuffus@rambler.ru

Неорганические пирофосфатазы семейства II с регуляторным доменом обнаружены в человеческих патогенных микроорганизмах. Структурные исследования этих ферментов в сочетании с имеющимися данными о механизме их действия позволят определить пути специфического подавления активности, что сделает их перспективными объектами для разработки новых селективных антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: неорганическая пирофосфатаза; малоугловое рассеяние

Одним из важнейших белков любого организма является неорганическая пирофосфатаза (PPase), которая присутствует во всех известных организмах, в том числе в клетках человека. Растворимые PPases семейства II являются наиболее активными и структурно разнообразными среди пирофосфатаз. Хотя трехмерные структуры были получены для нескольких семейств II PPases, детальная структурная информация недоступна для пирофосфатаз, содержащих регуляторную вставку, включающую пару доменов цистатион- β -синтазы (CBS) (CBS-PPases) [1]. Попытки кристаллизации полноразмерного фермента, содержащего CBS-домен, представляют собой серьезную проблему и до настоящего времени не увенчались успехом. Регуляция CBS-PPase происходит по кооперативному механизму [2]. Однако установление основных регулирующих механизмов взаимодействия между доменами представляет большую проблему, поскольку данные о структуре полноразмерного фермента отсутствуют. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) нами была определена структура каталитического домена белка CBS-PPase из *Desulfotobacterium hafniense* (dh-PPase). Мы обнаружили, что каталитический домен dh-PPase в растворе существует в виде гомодимера и его структура аналогична структуре канонической пирофосфатазы семейства II [3]. Кроме того, ранее было выявлено, что введение мутации в каталитическую часть dh-PPase приводит к потере кинетической кооперативности у белка, при этом, как мы показали, в растворе мутированный полноразмерный белок образует структуры отличные от тех, что наблюдаются у нативного белка. Полученная в ходе исследования информация о структуре каталитического домена CBS-PPase позволит определить способы регуляции активности фермента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00918.

Литература:

1. Jämsen J., Tuominen H., Salminen A., Belogurov G., Magretova N., Baykov A. & Lahti R. A CBS domain-containing pyrophosphatase of *Moorella thermoacetica* is regulated by adenine nucleotides//*Biochem.* 2007. Vol. 408. № 3. P. 327-333.
2. V.A. Anashkin, A. Salminen, H. Tuominen, V.N. Orlov, R. Lahti, and A.A. Baykov. Cystathionine β -Synthase (CBS) Domain-containing Pyrophosphatase as a Target for Diadenosine Polyphosphates in Bacteria//*The Journal of Biological Chemistry.* 2015. Vol. 290. № 46. P. 27594-27603.
3. Shinbyoung Ahn, Andrew J Milner, Klaus Fütterer, Monika Konopka, Mohammad Ilias, Tom W Young, Scott A White. The "open" and "closed" structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*//*Journal of Molecular Biology.* 2001. Vol. 313. № 4. P. 797-811.

UDC 577.325.6

STRUCTURAL RESEARCH OF CATALYTIC DOMAIN OF CBS-PYROPHOSPHATASE BY A SMALL-ANGLE X-RAY SCATTER FOR DETERMINING METHODS OF REGULATION OF ACTIVITY OF THE ENZYME

E.Y. Soshinskaia, I.D. Deltzov, L.A. Dadinova

*Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
 119333, Moscow, Leninsky prospekt, 59
 e-mail: katuffus@rambler.ru*

Inorganic pyrophosphatases of family II with a regulatory domain were found in human's pathogenic microorganisms. Structural studies of these enzymes in combination with the available data on the mechanism of their action will make it possible to determine ways of specific suppression of activity, which will make them promising targets for the development of new selective antibacterial drugs.

Key words: inorganic pyrophosphatase; small-angle scattering

One of the most important proteins of any organism is inorganic pyrophosphatase (PPase), which is present in all known organisms, including in human cells. Soluble PPases of family II are the most active and structurally diverse among pyrophosphatases. Although three-dimensional structures were obtained for several families of II PPases, detailed structural information is not available for pyrophosphatases containing a regulatory insert that includes a cystathion- β -synthase (CBS) domain pair (CBS-PPases) [1]. Attempts to crystallize a full-sized enzyme containing a CBS domain are a serious problem and have so far not been successful. The regulation of CBS-PPase occurs through a cooperative mechanism [2]. However, the establishment of the main regulatory mechanisms of interaction between domains is a big problem, since data on the structure of the full-sized enzyme are absent. Using the small-angle X-ray scattering (SAXS) method, we determined the structure of the catalytic domain of the CBS-PPase protein from *Desulfitobacterium hafniense* (dh-PPase). We found that the catalytic domain of dh-PPase in solution exists as a homodimer and its structure is similar to that of family II canonical pyrophosphatase [3]. In addition, it was previously revealed that the presense of a mutation into the catalytic part of dh-PPase leads to a loss of kinetic cooperativity in the protein, while, as we have shown, in solution the mutated full-length protein forms structures different from those observed in the native protein. The information of the structure of the catalytic domain CBS-PPase obtained during the study will make it possible to determine how to regulate the activity of the enzyme.

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research in the framework of a research project № 18-34-00918.

References:

1. Jämsen J., Tuominen H., Salminen A., Belogurov G., Magretova N., Baykov A. & Lahti R. A CBS domain-containing pyrophosphatase of *Moorella thermoacetica* is regulated by adenine nucleotides//*Biochem.* 2007. Vol. 408. № 3. P. 327–333.
2. V.A. Anashkin, A. Salminen, H. Tuominen, V.N. Orlov, R. Lahti, and A.A. Baykov. Cystathionine β -Synthase (CBS) Domain-containing Pyrophosphatase as a Target for Diadenosine Polyphosphates in Bacteria//*The Journal of Biological Chemistry.* 2015. Vol. 290. № 46. P. 27594-27603.
3. Shinbyoung Ahn, Andrew J Milner, Klaus Fütterer, Monika Konopka, Mohammad Ilias, Tom W Young, Scott A White. The "open" and "closed" structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*//*Journal of Molecular Biology.* 2001. Vol. 313. № 4. P. 797-811.

УДК: 577, ББК: 28.072

ФРАГМЕНТЫ ОДНОТЯЖЕВЫХ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С РЕТИНОБЛАСТОМОЙ: СВЯЗЬ С ОНКОГЕНЕЗОМ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Ермаков К.В., Бухвостов А.А.

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия,
117997, Москва, Островитянова, 1,
e-mail: ermakovkv07@gmail.com

В отличие от здоровых доноров у пациентов с ретинобластомой в плазме крови обнаружена значительная популяция ($6,84 \pm 0,56$ нг·мл⁻¹) ультракоротких (50-150н) однотяжевых фрагментов ДНК (single stranded DNA, ssDNA). Для этого разработана оригинальная методика высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В данной работе оценивается потенциал этой методики для исследования онкогенеза и ранней лабораторной диагностики ретинобластомы.

Ключевые слова: ретинобластома, плазма крови, ссДНК, однотяжевые фрагменты ДНК, ВЭЖХ

Алгоритм исследования включал последовательные этапы, начиная с получения плазмы крови, не содержащей экзосом, и последующего выделения внеклеточной ДНК (circulating free DNA, cfDNA). Фенольную экстракцию ДНК плазмы завершали обработкой образцов нуклеазами фага лямбда, E.coli III, S1 Aspergillus oryzae и протеиназой К. Каскадную ультрафильтрацию на мембранах K75/K25 SPM Tech-Sep (Mirabel, Франция) использовали затем для концентрирования фрагментов ДНК с размерами 40-400н. Устойчивые к экзонуклеазам фага лямбда и III компоненты анализировали с помощью эксклюзионно-анионообменной ВЭЖХ на колонке 4,6×150,0 мм со стационарной фазой PRP-X600 (полиметиламидо пропилметакриламид), применяя синхронизированный линейный градиент элюции pH 8,0-4,0/0-2,5 M LiCl₂, сформированный на основе Трис-ацетонитрила (85:15, v/v). Эффективность фракционирования фрагментов ssDNA сравнивали с таковой, достигаемой с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

1. У больных с ретинобластомой в плазме крови присутствуют ультракороткие ssDNA. Эти фрагменты ДНК резко отличаются по размерам (50-150н) от фрагментов, найденных в плазме здоровых доноров (350-400н), и соответствуют размерам репарационных «вставок», характерных для клеток ретинобластомы. Содержание ssDNA в плазме больных значительно выше, чем в плазме доноров контрольной группы.

2. Предложенная в данной работе методика ВЭЖХ позволяет обнаруживать в пуле ssDNA субпопуляции ультракоротких фрагментов, различающихся по размерам и заряду. Разработанная методика выгодно отличается по разрешающей способности от ПЦР и рутинного электрофореза в геле агарозы. Это делает ее привлекательной для решения аналитических задач в клинической и экспериментальной онкологии.

Литература:

1. Fernando MR, Jiang C, Kryzanowski GD, Ryan WL. Analysis of human blood plasma cell-free DNA fragment size distribution using EvaGreen chemistry based droplet digital PCR. *Clin Chim Acta* 2018; 483: 39-47. DOI: 10.1016/j.cca.2018.04.017
2. Aimar P, Meireles M. Calibration of ultrafiltration membranes against size exclusion chromatography columns. *J Membr Sci* 2010; 346: 233-39. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.09.018
3. Vong JSL, Tsang JCH, Jilang P, Lee WS, Leung TY, Chan KCA, Chiu RWK, Chiu YM, Lo D. Single-stranded DNA library preparation preferentially enriches short maternal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2017; 63: 1031-37. DOI: 10.1373/clinchem.2016.268656
4. Dewar JM, Lyndall D. Simple non-radioactive measurement of single-stranded DNA. In: Bjergbaek L, ed. *Methods in molecular biology: DNA repair protocols*, Totowa NJ: Humana Press, 2012; 920: 341-48.
5. Catachura SC, Leys N, Mastroleo J. Quorum sensing in life support system. In: Kalia VC, ed. *Quorum sensing*, Singapore: Springer Nature, 2018: 249-60.

UDC: 577

SINGLE STRANDED DNA FRAGMENTS IN RETINOBLASTOMA PATIENT BLOOD PLASMA: LINK TO ONCOGENESIS AND DIAGNOSTIC VALIDITY

Ermakov K.V., Bukhvostov A.A.

Pirogov Russian National Research Medical University, Russia,
117997, Moscow, Ostrovityanova, 1
e-mail: ermakovkv07@gmail.com

A significant population of ultrashort (50n – 150n) single-stranded DNA fragments were found in exosome-free blood plasma of retinoblastoma patient (6.84 ng x mL⁻¹), but not in plasma of healthy donors. An original HPLC technique has been employed. Its applicability to diagnostics and oncogenesis research is quizzed here.

Key words: retinoblastoma, blood plasma, cfDNA, ssDNA, HPLC

5.0 year old male retinoblastoma (2A) patient and four same age/sex healthy donors were taken for blood plasma cfDNA extraction. A consequent treatment of DNA extract with exonucleases I and III, S1 nuclease, and proteinase K was followed then by a cascade ultrafiltration on K75/K25 SPM TechSep membranes (Mirabel, France). I/III-nuclease resistant 25K – 75K compounds were analysed by size exclusion/anion exchange HPLC. For this purpose, its key parameters were estimated as the followings: stationary phase – polymethylamidopropylmet hacrylamide; column PRP-X600 AE, 4.6 x 150.0mm, 5.0μ particles, 1.6 meq/mL (Hamilton Corp., USA); 1,800 p.s.i., 22°– 25°C, 0.8 mL/min elution rate. Both synchronous linear elution LiCl₂(0 – 2.5M) and pH (8.0 – 4.0) gradients were formed on 100mM Tris/acetonitrile (85:15, v/v). Waters/Hamilton compatible Breeze 200SLE Analytical System, W2998 UV-Detector (254nm), W600E gradient former (Waters, Inc., USA). Sample loading: 80 – 100mg DNA in 50mL 100mM Tris-HCl (pH 8.0)/acetonitrile (85:15. v/v).

1. As mentioned above, ssDNA short fragments were found in plasma of retinoblastoma patient. To the contrast, in control donors, a smaller population of ssDNA (2.40 – 2.82 ng x mL⁻¹) was found consisting of essentially larger, 350n– 400n, sequences. 2. Noteworthy, a separation efficiency shown by our HPLC technique allows to reveal the size/charge – different populations within an ssDNA pool in cancer plasma which is not always possible in both PCR-based DNA size estimations and a routine agarose gel electrophoretic procedures. Particularly, a PCR measurement of ssDNA size may look not a right choice assuming the DNA repair related origin of these short cfDNA fragments. The later would mean a possible release of ssDNA directly in the “cancer-booming” DNA defects replacement. So we consider the HPLC proposed as a simple and reliable tool for further epigenic and diagnostic studies on patients with retinoblastoma and, perhaps, with some other malignancies.

References:

1. Fernando MR, Jiang C, Kryzanowski GD, Ryan WL. Analysis of human blood plasma cell-free DNA fragment size distribution using EvaGreen chemistry based droplet digital PCR. *Clin Chim Acta* 2018; 483: 39-47. DOI: 10.1016/j.cca.2018.04.017
2. Aimar P, Meireles M. Calibration of ultrafiltration membranes against size exclusion chromatography columns. *J Membr Sci* 2010; 346: 233-39. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.09.018
3. Vong JSL, Tsang JCH, Jilang P, Lee WS, Leung TY, Chan KCA, Chiu RWK, Chiu YM, Lo D. Single-stranded DNA library preparation preferentially enriches short maternal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2017; 63: 1031-37. DOI: 10.1373/clinchem.2016.268656
4. Dewar JM, Lyndall D. Simple non-radioactive measurement of single-stranded DNA. In: Bjergbaek L, ed. *Methods in molecular biology: DNA repair protocols*, Totowa NJ: Humana Press, 2012; 920: 341-48.
5. Catachura SC, Leys N, Mastroleo J. Quorum sensing in life support system. In: Kalia VC, ed. *Quorum sensing*, Singapore.

УДК 616.006.48

ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Степаненко А.А., Андреева С.В., Корец К.В., Микитенко Д.А., Гулеюк Н.Л., Баклаушев В.П., Чехонин В.П.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П.

Сербского» Минздрава России, Москва, Россия

119034, Москва, пер. Кропоткинский, д. 23

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

Институт Молекулярной Биологии и Генетики, Национальная Академия Наук Украины, Киев, Украина

03680, Киев, ул. Заболотного, д. 150

Длительная обработка клеток глиобластомы клиническим цитотоксическим препаратом темозоломидом (ДНК-алкилирующий агент), таргетным клиническим препаратом темзиролимузом (ингибитор mTOR киназы) или экспериментальным таргетным ингибитором U0126 (ингибитор MEK1/2 киназы) приводит к существенным изменениям кариотипа и фенотипа опухолевых клеток.

Ключевые слова: глиобластома; темозоломид; онкология; химиорезистентность; хромосомная нестабильность

Геномная нестабильность создает генетическую и фенотипическую гетерогенность, которая позволяет популяции раковых клеток адаптироваться и выживать в суровых условиях. Цитотоксические стрессы, включая стресс, опосредованный медикаментозным лечением, и трансгенные манипуляции могут усиливать геномный хаос опухолевых клеток и способствовать появлению новых фенотипических вариантов, увеличивая эволюционный потенциал опухоли [1,2,3]. Для демонстрации изменений кариотипа-фенотипа как адаптивного ответа на стрессовые состояния, мы охарактеризовали хромосомную нестабильность (CIN, клональные и неклональные хромосомные aberrации) и фенотипические изменения линий раковых клеток после применения различных цитотоксических стрессов. Были получены терапевтически резистентные дериваты клеточных линий глиобластомы U251, T98G и C6 путем длительного культивирования в среде с добавлением темозоломида (ДНК метилирующий агент), темзиролимуза (ингибитор mTOR киназы) или U0126 (ингибитор MEK1/2 киназы). Геномные и фенотипические изменения анализировали с помощью классической и молекулярной цитогенетики, полимеразной цепной реакции и Вестерн-блоттинга, проводили оценку пролиферации, миграции и инвазии клеток, а также роста в мягком агаре. Длительная обработка клеток генотоксическим препаратом темозоломидом увеличивало геномную нестабильность клеток U251 и T98G, но при этом селектировала генетически стабильные клоны клеток C6 [4]. Длительная обработка темзиролимузом или U0126 увеличивала геномную гетерогенность клеток U251 и T98G [5]. Клетки, длительно обработанные химиопрепаратами, демонстрировали разнообразные фенотипические изменения, зависящие от клеточной линии и препарата. Повышение устойчивости клеток к повторной обработке терапевтическим препаратом было единственным предсказуемым фенотипическим признаком, присущим всем опухолевым клеткам, которые обрабатывали химиопрепаратами в течение длительного времени [4,5]. В заключение стоит отметить, что длительная обработка клеток химиопрепаратами приводит к селекции устойчивых вариантов генотипа-фенотипа или генерирует новые фенотипы путем усиления геномного хаоса. Гетерогенность, обусловленная геномной нестабильностью, и сложное перепрограммирование путей передачи сигнала ответственны за адаптацию популяции опухолевых клеток к цитотоксическим стрессам различной природы.

Литература:

1. Stepanenko AA, Kavsan VM. Evolutionary karyotypic theory of cancer versus conventional cancer gene mutation theory//Biopolym Cell. 2012.Vol. 28. № 4. P. 267-80.
2. Stepanenko AA, Kavsan VM. Immortalization and malignant transformation of Eukaryotic cells//Cytol Genet. 2012. Vol. 46. № 2. P. 96-129.
3. Stepanenko A, Andreieva S, Korets K, Mykytenko D, Huleyuk N, Vassetzky Y, Kavsan V. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells//Mutat Res Mol Mech Mutagen. 2015.Vol. 771. P. 56-69.
4. Stepanenko AA, Andreieva S V, Korets K V, Mykytenko DO, Baklaushev VP, Huleyuk NL, Kovalova OA, Kotsarenko KV, Chekhonin VP, Vassetzky YS, Avdieiev SS, Dmitrenko VV. Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells//Cancer Cell Int. 2016.Vol. 16. P. 36.

5. Stepanenko AA, Andreieva SV, Korets KV, Mykytenko DO, Baklaushev VP, Chekhonin VP, Dmitrenko VV. mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells//Gene. 2016.Vol. 579. № 1. P. 58-68.

UDC 616.006.48

CHROMOSOMAL INSTABILITY AND GENETIC HETEROGENEITY AS A UNIVERSAL MECHANISM OF THERAPEUTIC RESISTANCE OF TUMOR CELLS

Stepanenko A.A., Andreieva S.V., Korets K.V., Mykytenko D.O., Huleyuk N.L., Baklaushev V.P., Chekhonin V.P.

V. P. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

119034, Moscow, lane Kropotkinsky, 23

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

Institute of Molecular Biology and Genetics, the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

03680, Kyiv, str. Zabolotnogo, 150

Long-term treatment of glioblastoma cells with a clinical cytotoxic drug temozolomide (DNA-alkylating drug), a targeted clinical drug temsirolimus (mTOR kinase inhibitor) or an experimental targeted inhibitor U0126 (MEK1/2 kinase inhibitor) leads to significant changes in the karyotype and phenotype of tumor cells.

Key words: glioblastoma; temozolomide; oncology; chemoresistance; chromosomal instability

Genomic instability produces genetic and phenotypic heterogeneity that allows a cancer cell population to adapt to and survive harsh microenvironments. Cytotoxic stresses including drug treatment-mediated stress and transgenic manipulations may intensify genomic chaos of tumor cells and favor the emergence of new phenotype variants, increasing the evolutionary potential of a tumor [1,2,3]. To provide evidence of karyotype-phenotype evolution as an adaptive response to stressful conditions, we characterized chromosomal instability (CIN, clonal and non-clonal chromosomal aberrations) and phenotypic changes of cancer cell lines after applying the different cytotoxic stresses. A panel of long-term temozolomide (DNA-alkylating drug), temsirolimus (mTOR kinase inhibitor), and U0126 (MEK1/2 kinase inhibitor)-treated U251, T98G and C6 glioblastoma cell lines was established. Genomic and phenotypic changes were analyzed by conventional and molecular cytogenetics, cell viability assay, trypan blue exclusion assay, soft agar colony formation assay, scratch wound healing assay, trans-well invasion assay, quantitative polymerase chain reaction, and Western-blotting. The long-term treatment with temozolomide increased genomic diversity of U251 and T98G cells but selected genetically stable clones of C6 cells [4]. The long-term treatment with temsirolimus or U0126 increased genomic heterogeneity of U251 and T98G cells [5]. The long-term drug/inhibitor-treated cells demonstrated distinct, cell line- and treatment-dependent, phenotypic changes. An increase of resistance to drug re-challenge was the only predictable phenotypic trait intrinsic to all long-term drug-treated tumor cells [4,5]. In conclusion, the long-term drug treatment selects resistant genotype-phenotype variants or generates novel versatile phenotypes by increasing genomic chaos. Genomic instability-driven multilayered heterogeneity and complex reprogramming of signal transduction pathways are responsible for adaptation of a tumor cell population to cytotoxic stresses.

References:

1. Stepanenko AA, Kavsan VM. Evolutionary karyotypic theory of cancer versus conventional cancer gene mutation theory//Biopolym Cell. 2012.Vol. 28. № 4. P. 267-80.
2. Stepanenko AA, Kavsan VM. Immortalization and malignant transformation of Eukaryotic cells//Cytol Genet. 2012. Vol. 46. № 2. P. 96-129.
3. Stepanenko A, Andreieva S, Korets K, Mykytenko D, Huleyuk N, Vassetzky Y, Kavsan V. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells//Mutat Res Mol Mech Mutagen. 2015.Vol. 771. P. 56-69.
4. Stepanenko AA, Andreieva S V, Korets K V, Mykytenko DO, Baklaushev VP, Huleyuk NL, Kovalova OA, Kotsarenko KV, Chekhonin VP, Vassetzky YS, Avdieiev SS, Dmitrenko VV. Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells//Cancer Cell Int. 2016.Vol. 16. P. 36.
5. Stepanenko AA, Andreieva SV, Korets KV, Mykytenko DO, Baklaushev VP, Chekhonin VP, Dmitrenko VV. mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells//Gene. 2016.Vol. 579. № 1. P. 58-68.

НЕЙРОБИОЛОГИЯ И НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИЯ

NEUROBIOLOGY AND BRAIN RESTORATION

1. АМИЛОИДНАЯ АГРЕГАЦИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ КАРБОКСИАНАГИДРАЗЫ, Фахранурова Л.И., Балобанов В.А., Марченков В.В., Глухов А.С., Рябова Н.А., Катина Н.С.	249
AMYLOID AGGREGATION OF CARBONIC ANHYDRASE MUTANT FORMS, Fakhranurova L.I., Balobanov V.A., Marchenkov V.V., Glukhov A.S., Ryabova N.A., Katina N.S.	250
2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УЧАСТКОВ БЕЛКОВ, ФОРМИРУЮЩИХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СТРУКТУРЕ АМИЛОИДОВ, Суворина М.Ю., Катина Н.С., Рябова Н.А., Ильина Н.Б., Сурин А.К.	251
DETERMINATION OF PROTEINS REGIONS THAT FORM INTERMOLECULAR INTERACTIONS IN AMYLOID STRUCTURE, Suvorina M.Y., Katina N.S., Ryabova N.A., Ilyina N.B., Surin A.K.	252

УДК 577.29

АМИЛОИДНАЯ АГРЕГАЦИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ КАРБОКСИАНАГИДРАЗЫ

Фахранурова Л.И.¹, Балобанов В.А.², Марченков В.В.², Глухов А.С.², Рябова Н.А.², Катина Н.С.²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, д. 3

²Институт белка РАН, Пущино, Россия
142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, д. 4
e-mail: LFakhranurova@gmail.com

Исследована амилоидная агрегация карбоксиангидразы дикого типа и двух ее мутантных форм, содержащих замены крупных гидрофобных остатков на аланин. Показано, что замена в одном из амилодогенных участков приводит к замедлению амилоидообразования, тогда как мутация в другом участке вызывает формирование неамилоидных агрегатов.

Ключевые слова: карбоксиангидраза; амилоиды; флуоресценция тιοфлавина Т; аминокислотные замены; кинетика агрегации

Формирование амилоидных агрегатов в органах и тканях человека связано с развитием ряда серьезных заболеваний. К настоящему времени не найдены способы лечения амилоидозов, это приводит к необходимости детального исследования амилоидной агрегации и факторов, влияющих на этот процесс.

Цель данной работы заключается в поиске аминокислотных замен, которые приводят к уменьшению амилоидогенности карбоксиангидразы. При выборе замен мы исходили из того, что белковые межмолекулярные взаимодействия стабилизируются преимущественно гидрофобными силами. Поэтому уменьшение гидрофобности аминокислотных остатков в амилодогенных участках, предположительно, будет приводить к ингибированию амилоидообразования [1]. С помощью теоретического алгоритма TANGO нами были определены амилодогенные участки карбоксиангидразы, которые соответствуют 138-146 и 205-210 амк. ост. [2]. Затем были получены мутантные формы с заменами, приводящими к уменьшению гидрофобности остатков в двух данных участках: L139A и I208A.

Кинетика амилоидообразования карбоксиангидразы дикого типа и ее мутантных форм была исследована методом флуоресценции тιοфлавина Т, структурные характеристики агрегатов были изучены методами электронной микроскопии и инфракрасной спектроскопии, агрегационную способность белков оценивали с помощью центрифугирования и последующего измерения концентрации белка в супернатанте.

Полученные данные свидетельствуют о том, что обе исследованные аминокислотные замены привели к уменьшению амилоидогенности карбоксиангидразы, однако механизм ингибирования амилоидообразования оказался различным. Введение замены L139A приводит к замедлению амилоидной агрегации по сравнению с белком дикого типа, тогда как мутация I208A вызывает формирование неамилоидных агрегатов. Представленные результаты могут быть использованы в дальнейшем для поиска подходов к управлению белковой агрегацией и ингибированию амилоидообразования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00935.

Литература:

1. Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C. M. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates // *Nature*. –2003. –Vol. 424, № 6950. – P. 805-808.
2. Fernandez-Escamilla A. M., Rousseau F., Schymkowitz J., Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins // *Nat. Biotechnol.* –2004. –Vol. 22, №10. –P. 1302-1306.

UDC 577.29

AMYLOID AGGREGATION OF CARBONIC ANHYDRASE MUTANT FORMS

Fakhranurova L.I.¹, Balobanov V.A.², Marchenkov V.V.², Glukhov A.S.², Ryabova N.A.², Katina N.S.²

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Russia
142290, Moscow region, Pushchino, Institutskaya st., 3

²Institute of Protein Research of RAS, Pushchino, Russia
142290, Moscow region, Pushchino, Institutskaya st., 4
e-mail: LFakhranurova@gmail.com

Amyloid aggregation of carbonic anhydrase wild type and its two mutant forms with substitutions of large hydrophobic residues by alanine have been studied. It was shown that the substitution in the first amyloidogenic region leads to slowing amyloid formation, while the mutation in the second region leads to formation of nonamyloid aggregates.

Key words: carbonic anhydrase; amyloid; thioflavin T fluorescence, amino acid substitutions, kinetic of aggregation

Formation of amyloid aggregates in organs and tissues of human leads to the development of serious diseases. To date treatment approaches of amyloidosis still remains to be found, this leads to the need for detailed investigation of amyloid aggregation and the factors affecting this process.

The aim of this work is to find amino acid substitutions that lead to decrease of carbonic anhydrase amyloidogenicity. In the selection of amino acid substitutions, we assumed that protein intermolecular interactions are stabilizing mainly by hydrophobic forces. Therefore, decrease of hydrophobicity of the amino acid residues in amyloidogenic regions is supposed to lead to inhibition of amyloid formation [1]. With use of theoretical algorithm TANGO we determined amyloidogenic regions of carbonic anhydrase which correspond to 138-146 and 205-210 a. a. res. [2]. Then mutant forms with substitutions that lead to the decrease of hydrophobicity of residues in both these regions were obtained: L139A and I208A.

Kinetics of amyloid formation of carbonic anhydrase wild type and its mutant forms were monitored by thioflavin T fluorescence, structural characteristics of aggregates were studied by methods of electron microscopy and infrared spectroscopy, aggregation propensity of proteins was estimated with use of centrifugation and subsequent measurement of protein concentration in supernatant.

Obtained data evidence, that the both studied amino acid substitutions led to decrease of carbonic anhydrase amyloidogenicity, however the mechanism of amyloid formation inhibition turned out to be different. Substitution L139A leads to slowing amyloid aggregation in comparison with wild type protein, while mutation I208A is a case of formation of nonamyloid aggregates. Presented results can be used further for search of approaches for control of protein aggregation and inhibition of amyloid formation.

Investigation was supported by financial assistance of RFBR in the context of the scientific project № 18-34-00935.

References:

1. Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C. M. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates // *Nature*. –2003. –Vol. 424, № 6950. – P. 805-808.
2. Fernandez-Escamilla A. M., Rousseau F., Schymkowitz J., Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins // *Nat. Biotechnol.* –2004. –Vol. 22, №10. –P. 1302-1306.

УДК 577.29

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УЧАСТКОВ БЕЛКОВ, ФОРМИРУЮЩИХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СТРУКТУРЕ АМИЛОИДОВ

Суворина М.Ю., Катина Н.С., Рябова Н.А., Ильина Н.Б., Сурин А.К.

ФГБУН Институт белка РАН, Пущино, Россия
142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, д. 4
e-mail: msuworina@yandex.ru

На примере карбоксиангидразы и мутантной формы апомиоглобина описан подход к определению амилоидогенных участков с использованием метода ограниченного протеолиза и tandemной масс-спектрометрии.

Ключевые слова: амилоиды, масс-спектрометрия, ограниченный протеолиз, инфракрасная спектроскопия, кросс-β-структура

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, содержащие кросс-β-структуру. Формирование амилоидов приводит к развитию заболеваний человека, таких как болезнь Альцгеймера, диабет второго типа и других. Показано, что степень выраженности амилоидозов зависит от структуры фибрилл [1]. В связи с этим в последние годы особое внимание уделяется исследованию структурных особенностей амилоидных агрегатов.

Одним из методов, используемых для исследования структуры амилоидов, является ограниченный протеолиз, который основан на том, что участки белков, формирующие взаимодействия в структуре агрегата, защищены от действия протеаз [2]. В данной работе этот подход был применен для определения амилоидогенных участков двух белков: карбоксиангидразы Б и мутантной формы апомиоглобина L115A. Фибриллы обрабатывали смесью протеаз, фрагменты агрегатов, устойчивые к гидролизу, осаждали центрифугированием и диссоциировали на отдельные пептиды добавлением кислоты. С помощью метода tandemной масс-спектрометрии были определены аминокислотные последовательности полученных пептидов и идентифицированы участки белка, формирующие взаимодействия в структуре амилоидов. В отличие от исследований, использовавших этот метод ранее, мы провели дополнительную количественную оценку пептидов по значению площади пиков ионов с величиной m/z , соответствующей каждому пептиду с помощью программы PEAKS Studio-7.5. Расчет концентрации пептидов позволяет получить информацию о вероятности расщепления участков цепи протеазами, и, следовательно, о плотности взаимодействий в структуре агрегата: плотно структурированные участки белка наименее подвержены гидролизу, и соответствующие пептиды регистрируются с максимальной концентрацией. Оказалось, что суммарная протяженность высококонцентрированных пептидов для обоих исследованных белков хорошо согласуется с процентным содержанием кросс-β-структуры, рассчитанной по данным инфракрасной спектроскопии. Можно предположить, что пептиды, регистрируемые после протеолиза в высокой концентрации, соответствуют участкам белков, формирующих кросс-β-структурный остов амилоидов. Тогда как пептиды, регистрируемые в низкой концентрации, соответствуют участкам, образующим менее стабильные межмолекулярные взаимодействия в структуре амилоидов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00935.

Литература:

1. Tycko R. Amyloid polymorphism: structural basis and neurobiological relevance // *Neuron*. – 2015. – Vol. 86, № 3. – P. 632-645.
2. Davis P. J., Holmes D., Waltho J. P., Staniforth R. A. Limited proteolysis reveals that amyloids from the 3D domain-swapping cystatin B have a non-native β-sheet topology // *J. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 427, № 15. – P. 2418-2434.

UDC 577.29

DETERMINATION OF PROTEINS REGIONS THAT FORM INTERMOLECULAR INTERACTIONS IN AMYLOID STRUCTURE

Suvorina M.Y., Katina N.S., Ryabova N.A., Ilyina N.B., Surin A.K.

*Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia
 142290, Moscow region, Pushchino, Institutskaya st., 4
 e-mail: msuworina@yandex.ru*

On the example of carbonic anhydrase and apomyoglobin mutant form the approach is described for determination of amyloidogenic regions with use of the method of limited proteolysis and tandem mass-spectrometry.

Key words: amyloids, mass-spectrometry, limited proteolysis, infrared spectroscopy, cross- β -structure

Amyloids represent fibrillar protein aggregates which contain cross- β -structure. Formation of amyloids leads to development of human diseases such as Alzheimer's disease, type two diabetes and others. It was shown that severity of amyloidosis depends on fibril structure [1]. In this regard in recent years particular attention is paid to investigation of the structural characteristics of amyloids.

One method used for investigation of amyloids structure is limited proteolysis, which is based on the fact that proteins regions formed interactions in aggregate structure are protected from protease action [2]. In this work this approach was used for determination of amyloidogenic regions of two proteins: carbonic anhydrase B and apomyoglobin mutant form L115A. Fibrills were treated by mixture of proteases; fragments of aggregates resistant to hydrolysis were precipitated by centrifugation and dissociated to separate peptides by acid addition. With use of tandem mass-spectrometry amino acid sequences of obtained peptides were determined, and protein regions formed interactions in amyloid structure were identified. In contrast to investigations used this method previously, we carried out additional quantitative estimation of peptides by value of peaks area of ions with m/z value corresponding to every peptides with use of PEAKS Studio-7.5 software. Estimation of peptides concentration allows getting information about probability of the cleavage of chain regions by protease, and, therefore, about density of interactions in aggregate structure: tightly structured protein regions are most protected from hydrolysis, and corresponding peptides are registered in maximal concentration. It turned out that total length of highly concentrated peptides for both studied proteins fits in well with percentage of cross- β -structure, calculated from infrared spectroscopy data. It can be assumed that peptides registered after proteolysis at high concentration correspond to proteins regions formed cross- β -structural core of amyloids. While peptides registered in low concentration correspond to proteins regions formed less stable intermolecular interactions in amyloids structure.

Investigation was supported by financial assistance of RFBR in the context of the scientific project № 18-34-00935.

References:

1. Tycko R. Amyloid polymorphism: structural basis and neurobiological relevance // *Neuron*. – 2015. – Vol. 86, № 3. – P. 632-645.
2. Davis P. J., Holmes D., Waltho J. P., Staniforth R. A. Limited proteolysis reveals that amyloids from the 3D domain-swapping cystatin B have a non-native β -sheet topology // *J. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 427, № 15. – P. 2418-2434.

БИОФАРМА

BIOPHARMACEUTICS

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ ИННОВАЦИОННЫЕ РЕШЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ И ФАРМАЦЕВТИКЕ

INTERNATIONAL SYMPOSIUM INNOVATIONS IN BIOTECHNOLOGY AND PHARMACEUTICS

1. БИОКОНВЕРСИЯ ФИТОСТЕРИНА В ТЕСТОСТЕРОН РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ MYCOBACTERIUM SMEGMATIS MC2155 С ДЕЛЕЦИЯМИ В ГЕНАХ ОКИСЛЕНИЯ СТЕРОИДНОГО ЯДРА, Карпов М.В., Стрижов Н.И., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В.	255
BIOCONVERSION OF PHYTOSTEROL TO TESTOSTERONE BY RECOMBINANT STRAINS OF MYCOBACTERIUM SMEGMATIS MC2155 WITH DELETIONS IN THE OXIDATION GENES OF THE STEROID NUCLEUS, Karpov M.V., Strizhov N.I., Sukhodolskaya G.V., Shutov A.A., Donova M.V.	256
2. ВНЕШНИЕ ИСКУССТВЕННЫЕ ЖЕЛЕЗЫ: ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ТЕЛЕМЕДИЦИНЕ, РЕКРЕАЦИИ, ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ СПОРТЕ, ВОЕННОМ ДЕЛЕ И ЖИВОТНОВОДСТВЕ, К.В.Попов.....	257
EXTERNAL ARTIFICIAL GLANDS: TECHNOLOGY AND ITS USE IN CHRONIC PATIENT TREATMENT, TELEMEDICINE, RECREATIONAL DRUG USE, PROFESSIONAL ATHLETE TRAINING, DEFENSE, AND ANIMAL FARMING, K.Popov	258
3. ВЫДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ОКОЛОУШНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ, Янушевская Ю. Д., Котова Н. В.	258
EXTRACTION OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES FROM THE SALIVARY GLAND OF THE NORTHERN DEER, Yanushevskaya J. D., Kotova N. V.	259
4. ВЫДЕЛЕНИЕ ГИАЛУРОНИДАЗЫ ИЗ СЕМЕННИКОВ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ, Лисун Е. А., Котова Н. В.	260
STUDYING THE COMPONENT COMPOSITION OF NORTHERN DEER TESTES, RECEIVING HYALURONIDASE, Lisun E.A., Kotova N.V.	261
5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ, Стучаева А.А., Караваева Л.И., Глазова Н.В.	262
ISOLATION AND PURIFICATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES FROM THE PANCREAS OF A REINDEER, Stuchaeva A.A., Karavaeva L.I. Glazova .N.V.	263
6. ГИБРИДНЫЕ АЭРОГЕЛИ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИКИ И МЕДИЦИНЫ, Меньшуткина Н.В., Гусева Е.В.	264
HIBRID AEROGELS FOR PHARMACEUTICS AND MEDICINE, Menshutina N.V., Guseva E.V.	265
7. ИНАКТИВАЦИЯ БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ УСТАНОВКИ ГЕНЕРАТОРА ИМПУЛЬСОВ ВЫСОКОГО НАПРЯЖЕНИЯ, Красильников И.В., Петров С.В., Дубов О.В.	266
INACTIVATION OF BACTERIA AND VIRUSES USING HIGH VOLTAGE PULSE GENERATOR PLANT, Krasilnikov I.V., Petrov S.V., Dubov O.V.	267
8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ, Красовицкая И. А., Котова Н.В., Глазова Н.В.	267
DETERMINATION OF ENZYME COMPLEX OF REINDEER PANCREAS, Krasovitskaya I.A., Kotova N.V., Glazova N.V.	268
9. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ БИОМАССЫ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК PANAX JAPONICUS И DIOSCOREA DELTOIDEA, Титова М.В., Шумило Н.А., Иванов И.М., Ключин А.Г., Кочкин Д.В., Куликова А. С., Фоменков А.А., Носов А.М.	269
OPTIMIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES PRODUCTION INDUSTRIAL TECHNOLOGY BASED ON PANAX JAPONICUS AND DIOSCOREA DELTOIDEA CELL SUSPENSION CULTURES, Titova M.V., Shumilo N.A., Иванов И.М., Ключин А.Г., Кочкин Д.В., Куликова А.С., Фоменков А.А., Носов А.М.	270

10. ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК VITEX AGNUS-CASTUS В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ , Володина Е. В., Володина С. О., Топкова О.В. ...	271
OBTAINING CALLUS CULTURE OF VITEX AGNUS-CASTUS CELLS AS A PRODUCER FOR BIOTECHNOLOGICAL OBTAINING OF PHYTOEXDYSTEROIDS, Volodina E.V., Volodina S.O., Topkova O.V.....	272
11. ПРОЦЕСС ПОЛУЧЕНИЯ АЭРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗАМЕНЫ РАСТВОРИТЕЛЯ ПОД ДАВЛЕНИЕМ, Лебедев А.Е., Сусллова Е.Н., Худеев И.И., Ловская Д.Д.	273
PRODUCTION OF BIOBASED AEROGELS USING SOLVENT EXCHANGE UNDER HIGH PRESSURE, Lebedev A.E., Suslova E.N., Khudeev I.I., Lovskaya D.D.....	274
12. РАЗРАБОТКА ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ БЫСТРОГО РАСШИРЕНИЯ РАСТВОРОВ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ФЛЮИДОВ, Лебедев Е.А., Митрофанов И.В.	275
PROCESS DEVELOPMENT FOR PRODUCING PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS BASED ON SUBMICRON PARTICLES UTILIZING RAPID EXPANSION OF SUPERCRITICAL SOLUTIONS, Lebedev E.A., Mitrofanov I.V.....	276
13. РАСШИРЕНИЕ СПЕКТРА АМПЛИФИКАЦИОННЫХ МЕТОДОВ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, Лысенко Н.С., Фрейлихман О.А., Ваганова А.Н., Мирошникова Н.К., Михайлов Н.В., Вербов В.Н.	277
EXPANDING THE RANGE OF AMPLIFICATION METHODS IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES, Lysenko N.S., Freylikhman O.A., Vaganova A.N., Miroshnikova N.K., Mikhailov N.V., Verbov V.N.	278
14. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТАГЕНОМНЫЕ ПОДХОДЫ В ОЦЕНКЕ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ДОБЫЧИ НЕФТИ НА МОРСКИХ МЕСТОРОЖДЕНИЯХ, Раманкулов Е.М.	279
METAGENOMIC APPROACHES FOR BIOSAFETY RISK ASSESSMENT OF THE SHALE OIL EXTRACTION, Ramankulov E.M.	280
15. ТЕХНОЛОГИЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БИОАНАЛИТОВ НА ПРИМЕРЕ IL-13 ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, Прохорова М.В.	281
ULTRA LOW BIOMARKER DETECTION EXEMPLIFIED BY IL-13 IN AUTOIMMUNE DESEASES, Prokhorova M.	282
16. УЛУЧШЕННОЕ ПРОНИКНОВЕНИЕ В КЛЕТКИ НОВЫХ N-(СУЛЬФОНИЛ)-ФОСФОРАМИДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, А.Ш.Держалова.....	282
ENHANCED CELLULAR UPTAKE OF NOVEL N-(SULFONYL)-PHOSPHORAMIDATE OLIGONUCLEOTIDES, A.Derhalova....	283
17. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ASPERGILLUS ORYZAE НА ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ, Прасолова В.Н., Володина Е.В., Топкова О.В.	284
THE ENZYMATIC ACTIVITY OF ASPERGILLUS ORYZAE AT OPTIMIZED NUTRIENT MEDIA, Prasolova V.N., Volodina E.V., Topkova O.V.	285

УДК 579.25+ 602.44

БИОКОНВЕРСИЯ ФИТОСТЕРИНА В ТЕСТОСТЕРОН РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ MYCOBACTERIUM SMEGMATIS MC²155 С ДЕЛЕЦИЯМИ В ГЕНАХ ОКИСЛЕНИЯ СТЕРОИДНОГО ЯДРА

Карпов М.В.^{1,2}, Стрижов Н.И.¹, Суходольская Г.В.¹, Шутов А.А.¹, Донова М.В.^{1,2}

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пущинский Научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия
142290, Пущино, проспект Науки, д. 5

² Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия
142290, Пущино, проспект Науки, д. 3

e-mail: mikemikekarp@mail.ru

На основе быстрорастущих сапротрофных микобактерий *M. smegmatis*, несущих делеции в генах окисления стероидного ядра, созданы рекомбинантные штаммы, гетерологически ко-экспрессирующие гены грибной 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы и микобактериальной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Показана высокая эффективность рекомбинантов в процессе получения тестостерона из растительных стероидов.

Ключевые слова: *Mycobacterium smegmatis*, фитостерин, стероиды, тестостерон, гетерологическая экспрессия

Тестостерон (Тс) является стероидом ряда андрогенов, высоко востребованным в медицинской практике для профилактики и терапии эндокринологических заболеваний и возрастных нарушений. Тс также является одним из важных предшественников в синтезе многих других важных стероидных препаратов. Актуальной задачей является создание экологически безопасного, экономичного и высокоэффективного одностадийного микробиологического способа его получения. Принципиально новые решения в области стероидной биотехнологии основаны на использовании генно-инженерных микроорганизмов и оптимизации процессов биоконверсии фитостероидов (Фс). Непатогенный быстрорастущий штамм *Mycobacterium smegmatis* mc²155 имеет промышленный потенциал в качестве продуцента стероидных соединений. Ключевыми промежуточными продуктами микробного метаболизма стероидов являются андрост-4-ен-3,17-дион (АД) и андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД). Синтез Тс из АД катализируют 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы/кетостероидредуктазы (17 β -ГСД), использующие НАДФН (реже НАДН) в качестве восстановительных эквивалентов реакции. Микобактериальные 17 β -ГСД характеризуются низкой активностью. Образование НАДФН из НАДФ⁺ главным образом происходит в окислительной фазе пентозофосфатного пути в результате работы двух основных ферментов глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФД) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6ФГД).

Целью работы явилось создание рекомбинантных штаммов *Mycobacterium smegmatis* mc²155, несущих делеционные мутации в генах ферментов окисления стероидного ядра и гетерологически ко-экспрессирующих гены 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы/кетостероидредуктазы гриба *Cochliobolus lunatus* и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Используя гомологическую рекомбинацию как метод для получения безмаркерных мутантов *M. smegmatis*, были введены делеции в гены, кодирующие ключевые ферменты катаболизма стероидов: 3-кетостероид-9 α -гидроксилазы, KshAB (гены - MSMEG_5925_kshA, MSMEG_6039_kshB) и 3-кетостероид-1-дегидрогеназы, KstD (ген MSMEG_5941_kstD). Одиночные мутанты *M. smegmatis* Δ kshA и *M. smegmatis* Δ kshB накапливали АДД в качестве конечного продукта биоконверсии стероидов. Для создания продуцента АД был получен двойной делеционный вариант с нокаутами в двух генах kshB и kstD. Результаты мутагенеза подтверждены ПЦР скринингом.

В компетентные клетки *M. smegmatis* Δ kshB и *M. smegmatis* Δ kshB Δ kstD были перенесены плазмидные генетические конструкции pNS25, позволяющие ко-экспрессировать гены 17 β -ГСД гриба *Cochliobolus lunatus* и Г6ФД *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в составе одного оперона.

В качестве субстрата биоконверсии использовали соевый Фс (β -ситостерин - 42,39%, кампастерин - 23,48%, стигмастерин - 26,08%, брассикастерин - 3,52%) с нагрузкой 20 г/л. Его трансформация с использованием полученных штаммов включала два последовательных этапа. На первом этапе происходит окисление Фс с образованием ключевых интермедиатов – АД и АДД – в условиях высокой аэрации культур клеток. На втором этапе в микроаэрофильных условиях полученные соединения восстанавливаются с образованием Тс. Максимальный выход продукта Тс составил 4,8 г/л (36,6 моль%) и

4,6 г/л (35,9 моль%) в культурах *M. smegmatis* ΔkshB (pNS25) и *M. smegmatis* ΔkshBΔkshD (pNS25), соответственно.

Результаты исследований могут быть использованы при создании одностадийного микробиологического способа получения терапевтических андрогенных стероидов из фитостеринов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-38-00829 мол_а.

UDC 579.25+ 602.44

BIOCONVERSION OF PHYTOSTEROL TO TESTOSTERONE BY RECOMBINANT STRAINS OF MYCOBACTERIUM SMEGMATIS MC²155 WITH DELETIONS IN THE OXIDATION GENES OF THE STEROID NUCLEUS

Karpov M.V.^{1,2}, Strizhov N.I.¹, Sukhodolskaya G.V.¹, Shutov A.A.¹, Donova M.V.^{1,2}

¹ G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, FRC Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia
142290, Pushchino, Prospect Nauki, 5

² Pushchino State Natural Science Institute, Pushchino, Russia
142290, Pushchino, Prospect Nauki, 3
e-mail: mikemikekarp@mail.ru

Recombinant strains heterologously co-expressing the genes of the fungal 17β-hydroxysteroid dehydrogenase and mycobacterial glucose-6-phosphate dehydrogenase are based on fast-growing saprotrophic mycobacteria *M. smegmatis* carrying deletions in the genes of the steroid nucleus oxidation. The high efficiency of recombinants in the process of producing testosterone from plant sterols has been shown.

Key words: *Mycobacterium smegmatis*, phytosterol, steroids, testosterone, heterologous expression

Testosterone (Ts) is a steroid of a number of androgens highly demanded in medical practice for the prevention and treatment of endocrinological diseases and age-related disorders. Ts is also one of the important precursors in the synthesis of many other important steroid drugs. Creating an environmentally safe, economical and highly efficient single-step microbiological method for its production is an important task. Fundamentally new solutions in the field of steroid biotechnology are based on the use of genetically engineered microorganisms and optimization of the phytosterols (Phs) bioconversion processes. The non-pathogenic, fast-growing *Mycobacterium smegmatis* mc²155 strain has industrial potential as a producer of steroid compounds. Androst-4-ene-3,17-dione (AD) and androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) are key intermediate products of the microbial metabolism of sterols. The synthesis of Ts from AD is catalyzed by 17β-hydroxysteroid dehydrogenases / ketosteroid reductases (17β-HSDs), using NADPH (less commonly NADH) as reducing equivalents of the reaction. Mycobacterial 17β-HSDs are characterized by low activity. The formation of NADPH from NADP⁺ mainly occurs in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway as a result of the operation of the two main enzymes, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6FGD).

The aim of the work was the creation of recombinant of *Mycobacterium smegmatis* mc²155 strains, carrying the deletion mutations in the genes of the steroid nucleus oxidation enzymes and heterologously co-expressing genes of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase / ketosteroid reductase from fungus *Cochliobolus lunatus*, and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Using homologous recombination as a method for producing markerless *M. smegmatis* mutants, deletions were introduced into the genes encoding the key enzymes of sterol catabolism: 3-ketosteroid-9α-hydroxylase, KshAB (the genes MSMEG_5925_kshA, MSMEG_6039_kshB) 3-ketosteroid-1-dehydrogenase, KstD (gene MSMEG_5941_kstD). Single mutants of *M. smegmatis* ΔkshA and *M. smegmatis* ΔkshB accumulated ADD as the final product of sterol bioconversion. To create ADD producer, a double deletion variant was produced with knockouts in two genes, kshB and kstD. The results of mutagenesis are confirmed by PCR screening.

Plasmid genetic constructs pNS25, allowing for the co-expression of the 17β-HSD genes of the fungus *Cochliobolus lunatus* and G6PD of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in one operon, were transferred into competent cells of *M. smegmatis* ΔkshB and *M. smegmatis* ΔkshBΔkshD.

Soybean Phs (β-sitosterol - 42.39%, campesterol - 23.48%, stigmasterol - 26.08%, brassicasterol - 3.52%) was used as a bioconversion substrate with a load of 20 g/l. Phs transformation using the obtained strains included

two successive stages. At the first stage, Phs oxidation occurs with the formation of key intermediates — AD and ADD — under conditions of high aeration of cell cultures. In the second stage, under microaerophilic conditions, the compounds are reduced to Ts. The maximum product yield of Ts was 4.8 g / l (36.6 mol%) and 4.6 g / l (35.9 mol%) in cultures of *M. smegmatis* ΔkshB (pNS25) and *M. smegmatis* ΔkshBΔkshD (pNS25), respectively.

The results of the research can be used to create a one-step microbiological method for producing therapeutic androgenic steroids from phytosterols.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-38-00829 mol_a.

УДК: 615.473.92

ВНЕШНИЕ ИСКУССТВЕННЫЕ ЖЕЛЕЗЫ: ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ТЕЛЕМЕДИЦИНЕ, РЕКРЕАЦИИ, ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ СПОРТЕ, ВОЕННОМ ДЕЛЕ И ЖИВОТНОВОДСТВЕ

К.В.Попов¹

¹Университет Калифорнии в Беркли, США, 94703, Berkeley, ул. Дерби, 1601 1/2,
e-mail: ceo@chipmed.tech

Была разработана технология микроинвазивных внешних искусственных желез. Мы расскажем о двух основных компонентах устройства: базовом патче и модульных картириджах, позволяющих модифицировать функционал железы без замены базового патча. Устройства на основе технологии искусственной железы имеют революционный потенциал в медицине и других областях хозяйства. Мы представим вниманию публики несколько кейсов, убедительно иллюстрирующих превосходство наших искусственных желез в различных областях, включая терапию хронических заболеваний, телемедицину, рекреационное использование активных веществ, профессиональный спорт, военное дело и животноводство.

Ключевые слова: микрофлюидика; микроэлектроника; искусственные железы; интернет живых вещей; биомодификация; цифровая евгеника; мультицелевые датчики; направленная доставка; биомониторинг; терапия хронических заболеваний; телемедицина; рекреационное использование активных веществ; профессиональный спорт; военное дело; животноводство.

Традиционные технологии доставки лекарств и активных веществ, такие как оральное или парентеральное введение, имеют ограничения в биодоступности, эффективности биологической активности или удобства использования. Поэтому ключевым методом введения, заменяющим и дополняющим традиционные, является подкожное введение с помощью микроигл.

Нами было разработано устройство, способное радикально улучшить пользовательский опыт подкожного введения активных веществ в биологические системы, в том числе в организмы людей и других крупных млекопитающих. Другие классические устройства не имеют датчиков уровня активного вещества в тканях, куда оно вводится, и информационного интерфейса с управляющим компьютером. Также ограничением является количество активного вещества, доступное пользователю, до тех пор пока потребуется замена хранящей камеры.

Мы представляем архитектуру и анализ производительности микроинвазивной искусственной железы на основе массива микроигл. Устройство содержит базовый патч с микроиглами, электронными управляющими элементами и интегрированным микрофлюидическим элементом, и сменный картридж с индивидуализированными датчиками и капсулами с активными веществами, доставляемыми в ткани на основе управляющих сигналов с базового патча. Работа устройства основана на потоках обогащённых физиологических жидкостей, что позволяет использовать высококонцентрированные растворы активных веществ, что позволяет хранить больший заряд на устройстве. Анализ производства устройства позволяет сделать вывод о его потенциале заменить традиционные технологии во многих индустриях, включая терапию хронических заболеваний, телемедицину, рекреационное использование активных веществ, профессиональный спорт, военное дело и животноводство.

Анализ производства устройства позволяет сделать вывод о его потенциале заменить традиционные технологии во многих индустриях, включая терапию хронических заболеваний, телемедицину, рекреационное использование активных веществ, профессиональный спорт, военное дело и животноводство.

УДК: 615.473.92

EXTERNAL ARTIFICIAL GLANDS: TECHNOLOGY AND ITS USE IN CHRONIC PATIENT TREATMENT, TELEMEDICINE, RECREATIONAL DRUG USE, PROFESSIONAL ATHLETE TRAINING, DEFENSE, AND ANIMAL FARMING

K.Popov¹

¹University of California, Berkeley, USA, 94703, Berkeley, Derby St, 1601 1/2

e-mail: ceo@chipmed.tech

We have developed a microinvasive external artificial gland technology. We will discuss two main device components: the base patch and modular cartridge system that allow to modify the gland functionality without replacing the base patch. The device based on the artificial gland technology have disruptive potential in medicine and other fields. We will showcase several use cases that convince the audience of the supremacy of our artificial gland technology, including chronic patient treatment, telemedicine, recreational drug use, professional athlete training, defense, and animal farming.

Key words: microfluidics; electronics; artificial gland; internet of life; biohacking; digital eugenics; multisensors; targeted delivery; biomonitoring; chronic patient treatment; telemedicine; recreational drug use; professional athlete training; defense; animal farming.

Drug delivery techniques like oral administration and parenteral injection have limitations, either in terms of drug efficiency or user convenience. Transdermal drug delivery via microneedles has thus become one of the modern day replacements for many traditional drug delivery routes.

This project focuses on a novel device to improve user experiences with transdermal drug delivery. Current active substance delivery devices lack an interface with tissue level sensor, and also are limited by the amount of active substance that can be stored in the reservoir.

We present the architecture of microinvasive transdermal artificial gland, composed of base patch and modular replacement cartridges. The base patch contains a microneedle array, electronic control and communication circuitry, and integrated microfluidic parts. The modular cartridge contains individualized sensors and active substance containers that are delivered to the tissue according top base patch control signals. The device is actuated with a flow-driven pump array, thus delivering active substance as demanded, on top of a continuous delivery that occurs simultaneously. The flow-driven nature of the device also allows the use of a more concentrated active substance solution, thus allowing the device to have a longer duration. After analyzing the overall fabrication procedure, we propose our device to be manufacturable in a short time span and to be affordable as compared to current devices. We present the use cases of the device in chronic patient treatment, telemedicine, recreational drug use, professional athlete training, defense, and animal farming.

After analyzing the overall fabrication procedure, we propose our device to be manufacturable in a short time span and to be affordable as compared to current devices. We present the use cases of the device in chronic patient treatment, telemedicine, recreational drug use, professional athlete training, defense, and animal farming.

УДК 57.085.42

ВЫДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ОКОЛОУШНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

Янушевская Ю. Д., Котова Н. В.

Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

197082, Санкт-Петербург, Богатырский пр., д. 48, корп. 1, кв. 296

e-mail: julya0795@mail.ru

Определен качественный и количественный состав биологически активных веществ околоушной железы северных оленей методами гельфильтрации, гель-электрофореза, ВЭЖХ.

Ключевые слова: амилаза, околоушная железа северного оленя, экстракция, гельфильтрация, гель-электрофорез.

Создание лекарственных средств из органов и тканей животных, особенно тех, которые ранее не использовались для производства и были отходами мясной индустрии, является очень актуальной проблемой в настоящее время.

В России, помимо традиционного использования крупного рогатого скота и свиней, в качестве донора органов для получения биологически активных веществ (БАВ) используется также и северный олень.

Целью работы являлось определение качественного и количественного содержания БАВ околоушной железы северных оленей.

Экстракция из околоушной железы, измельченной до размера 5–8 мм, проводилась изотоническим раствором (при соотношении сырьё – экстрагент 1:1) в течение 1 часа при перемешивании на магнитной мешалке при температуре 1–5 °С. Далее проводилось отделение жмыха центрифугированием при охлаждении [1]. В полученном экстракте показана высокая активность амилазы – 300 ЕД/мл.

Был проведен гельфильтрационный анализ экстракта околоушной железы северного оленя на сефадексе G-75 (фирма "Sigma"). Данный анализ показал, что в экстракте присутствует два белковых пика: I пик – около 50 кДа (проявляет амилазную активность), что соответствует α-амилазе; II пик – около 31 кДа (не проявляет амилазную активность). Таким образом, белковые примеси имеют молекулярную массу ниже, чем целевой продукт. Поэтому они могут быть отделены от амилазы сорбционно-хроматографическими и мембранными методами.

Для подтверждения компонентного состава экстракта околоушной железы северного оленя был использован электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли [2]. Показано, что гель-электрофореграмма полностью подтверждает результаты гельфильтрационного анализа.

Получение очищенного экстракта для анализа аминокислот проводилось методом высаливания. Высаливание белков в экстрактах проводили сульфатом аммония при степени насыщения 0,8. Отделение осадка осуществлялось центрифугированием при охлаждении в течение 15 минут при частоте 11000 об/мин. В прозрачном супернатанте проводился аминокислотный анализ методом ВЭЖХ. Данный анализ показал, что в экстракте околоушной железы северного оленя содержится 14 аминокислот, из которых 7 являются незаменимыми.

Литература:

1. Ларцев С. Н., Потапов К. А., Пак М. Ф., Душичкина И. В., Пак А. В., Пак Т. В. Способ получения полуфабриката из эндокринного, ферментного и специального сырья животных для производства биологически активных препаратов//Патент СССР № 1837784;
2. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4//Nature. 1970. № 227. P. 680-685.

UDK 57.085.42

EXTRACTION OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES FROM THE SALIVARY GLAND OF THE NORTHERN DEER

Yanushevskaya J. D., Kotova N. V.

Saint-Petersburg Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia
197082, Saint-Petersburg, Bogatyrskiy ave 48, bld. 1, apt. 296
e-mail: julya0795@mail.ru

The qualitative and quantitative composition of biological active substances of the salivary gland of northern deers was determined by the methods of gel-filtration, gel-electrophoresis and HPLC.

Key words: amylase, the salivary gland of the northern deer, extraction, gel-filtration, gel-electrophoresis.

The creation of pharmaceutical drugs from animals' organs and tissues, especially which didn't use to use for production and were the wastes of meat industry, is very actual now.

In Russia, except traditional using cattle and pigs northern deer is also used as a donor of organs for obtaining biological active substances.

The goal of the work was determination of qualitative and quantitative composition of biological active substances of the salivary gland of northern deers.

Extraction from a salivary gland crushed to size 5 – 8 mm, was carried out by isotonic solution (at a ratio raw

material–extragent of 1:1) for 1 hour, with mixing on magnetic stirrer at the temperature of 1-5 °C. Then there was the separation of presscake by centrifugation under cooling. High activity of amylase – 300 U/ml was shown in the obtained extract.

The gel filtration analysis of the extract of salivary gland of northern deer was carried out. That analysis showed that there were two protein peaks. The first peak is about 50 kDa (it reveals amylolytic activity), that fits α-amylase; the second peak is about 31 kDa (it doesn't reveal amylolytic activity). Thus, protein impurities have less molecular weight, in comparison with the target product. That's why they can be separated from the amylase by sorption-chromatographic and membrane methods.

For confirming component compound of the extract of the salivary gland of northern deers, Laemmli electrophoresis of proteins in polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate was carried out. There was shown that gel-electrophoregram completely confirms the results of gel filtration analysis.

Obtaining purified extract for amino-acid analysis was carried out by the method of salting out. Salting out proteins in the extract was performed with ammonium sulfate at the degree of saturation of 0,8. Separation of precipitate was carried out by centrifugation under cooling for 15 minutes at the rate of 11000 rpm. Amino-acid analysis was carried out in the transparent supernatant by the method of HPLC. This analysis revealed that there are 14 amino acids in the extract of the salivary gland of the northern deer, of which 7 are irreplaceable.

References:

1. Lartsev S. N., Potapov K. A., Pack M. F., Dushichkina I. V., Pack A. V., Pack T. V. The method of obtaining semi-finished product from endocrine, enzyme and special animal raw material for production biological active drugs//USSR patent № 1837784;
2. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4//Nature. 1970. № 227. P. 680-685.

УДК 637.047

ВЫДЕЛЕНИЕ ГИАЛУРОНИДАЗЫ ИЗ СЕМЕННИКОВ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

Лисун Е.А., Котова Н.В.

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия
197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А
e-mail: katerina.lisun@gmail.com

Разработана методика получения экстракта из семенников Северного оленя. Определён качественный и количественный состав биологически активных веществ семенников Северного оленя.

Ключевые слова: гиалуронидаза, экстракция, семенники Северного оленя, гельфильтрация, ВЭЖХ.

Гиалуронидаза или «фактор распространения», вызывает распад гиалуроновой кислоты до глюкозамина и глюкуроновой кислоты и тем самым уменьшает ее вязкость. Гиалуронидаза вызывает увеличение проницаемости тканей и облегчает движение жидкостей в межтканевых пространствах [1].

В России, помимо традиционного использования КРС и свиней, в качестве донора органов используется также и Северный олень. Сырьё Северного оленя содержит более 80 жизненно важных для организма веществ: аминокислоты, гормоны, пептиды, различные минеральные вещества. Богатство и сложность химического состава сырья определяет его воздействие на организм человека. Биологически активные вещества, содержащиеся в органах и тканях северных оленей, участвуют в восстановлении энергетического баланса, повышают иммунитет, замедляют процессы старения в организме, нормализуют обмен веществ и т. д. [2].

Целью работы являлись подбор оптимальных условий проведения процесса экстракции гиалуронидазы из семенников Северного оленя и определение количественного и качественного состава экстракта.

Были подобраны оптимальные условия проведения процесса экстракции гиалуронидазы из семенников Северного оленя в зависимости от времени экстракции, степени измельчения сырья и соотношения объёма фаз экстрагента и сырья [2].

Гельхроматографический анализ экстракта гиалуронидазы из семенников Северного оленя показал, что экстракт гиалуронидазы является многокомпонентной системой. Из трёх пиков на гельхроматограмме только первые два соответствуют фракциям с гиалуронидазной активностью [3]. При помощи метода ВЭЖХ был определён аминокислотный состав экстракта из семенников Северного оленя. Как показал анализ, в семенниках содержится 16 аминокислот, из которых присутствует полный набор незаменимых

кислот – 10 (63% от суммы аминокислот). Незаменимые аминокислоты не могут синтезироваться организмом человека и животных из других соединений, они обязательно должны поступать вместе с пищей или кормом. Абсолютно незаменимых аминокислот десять, и все они присутствуют в семенниках Северного оленя.

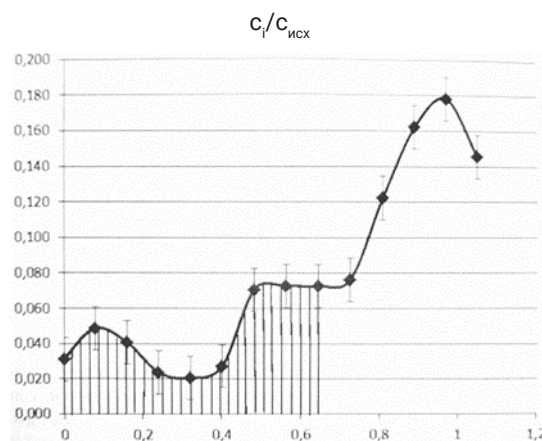


Рис. 1. ГХ экстракта из семенников Северного оленя

Исследование экстракта из семенников Северного оленя показало перспективу использования данных органов Северного оленя для получения активных фармацевтических субстанций.

Литература:

1. Meyer K. Hyaluronidases // *The Enzymes*, Vol. 5 – NY: Academic Press, 1971 – pp. 307 – 320.
2. Якин О. Г. Разработка промышленной технологии получения высокоочищенного препарата тестикулярной гиалуронидазы: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Уфа, 2001.
3. Глазова Н. В., Элиханов А. М. Способ получения гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота // Патент РФ №2658605, 11.06.2018.

UTC 637.047

STUDYING THE COMPONENT COMPOSITION OF NORTHERN DEER TESTES, RECEIVING HYALURONIDASE

Lisun E.A., Kotova N.V.

St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia
197022, St. Petersburg, Professor Popov str., 14, lit. A
e-mail: katerina.lisun@gmail.com

A method has been developed for obtaining an extract from Reindeer testes. The qualitative and quantitative composition of the biologically active substances of the reindeer testes was determined.

Key words: hyaluronidase, extraction, reindeer testicles, gelfiltration, HPLC.

Hyaluronidase, or “proliferation factor,” causes the breakdown of hyaluronic acid to glucosamine and glucuronic acid and thereby reduces its viscosity. Hyaluronidase causes an increase in tissue permeability and facilitates the movement of fluids in interstitial spaces [1].

In Russia, in addition to the traditional use of cattle and pigs, the Reindeer is also used as an organ donor. Reindeer raw materials contain more than 80 substances vital for the body: amino acids, hormones, peptides, various minerals. The richness and complexity of the chemical composition of raw materials determines its effect on the human body. Biologically active substances contained in the organs and tissues of reindeer are involved in restoring energy balance, increase immunity, slow down the aging process in the body, normalize metabolism, etc. [2].

The aim of the work was to select the optimal conditions for the process of extraction of hyaluronidase from

the seed of the reindeer and to determine the quantitative and qualitative composition of the extract.

The optimal conditions for the process of extraction of hyaluronidase from the seed of the reindeer were selected depending on the extraction time, the degree of grinding of the raw material and the ratio of the volume of the phases of the extractant and the raw material [2].

Gelchromatographic analysis of hyaluronidase extract from reindeer testes showed that hyaluronidase extract is a multicomponent system. Of the three peaks on the gel chromatogram, only the first two correspond to fractions with hyaluronidase activity [3]. Using the HPLC method, the amino acid composition of the extract from Reindeer testes was determined. As the analysis showed, the testes contain 16 amino acids, of which there is a complete set of essential acids - 10 (63% of the total amino acids). Essential amino acids cannot be synthesized by the human body and animals from other compounds, they must necessarily come with food or feed. Absolutely essential amino acids are ten, and they are all present in the testes of Reindeer.

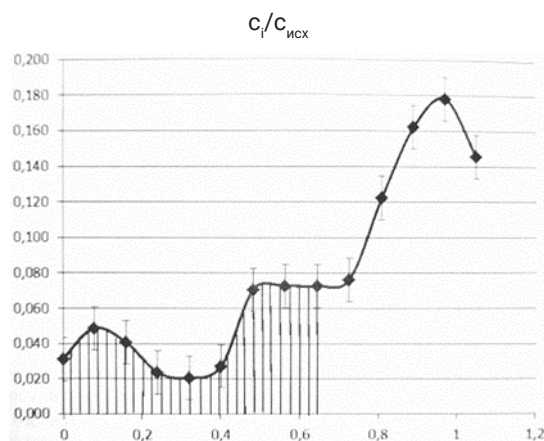


Fig. 1. GC extract from the testes of Reindeer

The study of the extract from the testes of reindeer showed the prospect of using these reindeer organs for the production of active pharmaceutical substances.

References:

1. Meyer K. Hyaluronidases // *The Enzymes*, Vol. 5 – NY: Academic Press, 1971 – pp. 307 – 320.
2. Yakin O. G. Development of industrial technology for obtaining highly purified testicular hyaluronidase preparation: Author's abstract dis. Cand. med. sciences. - Ufa, 2001.
3. Glazova N.V., Elikhanov A.M. Method for obtaining hyaluronidase from cattle testes // Patent of the Russian Federation No. 2658605, 11.06.2018.

УДК 602:636.9

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

Стучаева А.А., Караваева Л.И., Глазова Н.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения РФ 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит.А

e-mail: anna.stuchaeva@pharminnotech.com

Разработана технология выделения и очистки протеолитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя. Проведено сравнение экстрактов поджелудочной железы северного оленя и поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Ключевые слова: протеазы, сорбенты, ультрафильтрация, крупный рогатый скот, северный олень.

Препараты, содержащие протеолитические ферменты (Химопсин, ООО «Самсон-Мед») производят из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Зачастую предприятие испытывает недостаток сырья.

При этом поджелудочная железа северного оленя до сих пор в промышленном масштабе не используется, хотя регионы крайнего севера России имеется достаточное количество сырья [1]. Поэтому актуальной задачей является разработка технологий выделения и очистки протеолитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя.

Подобраны условия экстракции протеолитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя, а так же проведено сравнение экстрактов из поджелудочной железы северного оленя и крупного рогатого скота. Показано, что в поджелудочной железе крупного рогатого скота протеазы содержатся в виде неактивных предшественников, а в поджелудочной железе северного оленя протеазы находятся в активной форме.

Для выделения и очистки протеолитических ферментов из полученного экстракта был проведен выбор оптимального сорбента. Наилучшим сорбентом оказался Purolite-C150, так как при сорбционно-хроматографическом выделении комплекса протеаз на котором достигается максимальный выход. Выходная кривая сорбции и десорбции протеолитических ферментов по белку и по ферментативной активности [2,3] на оптимальном сорбенте представлена на рисунке 1.

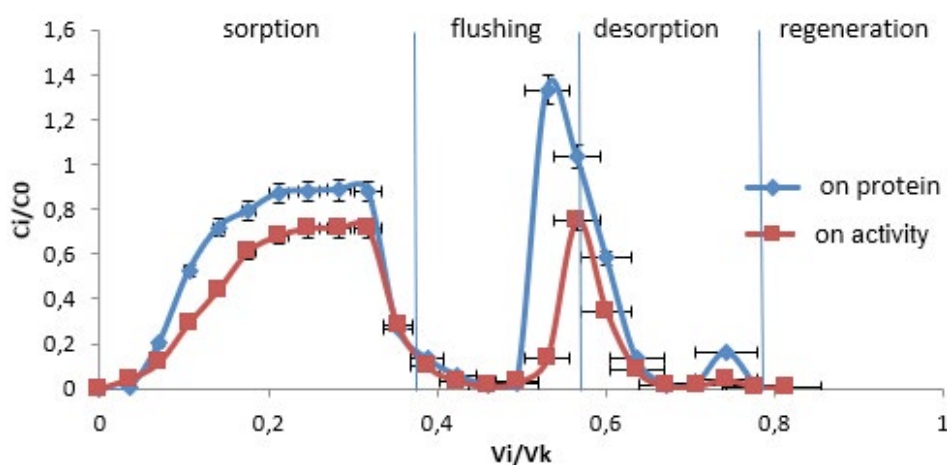


Рис. 1. Выходная кривая сорбции и десорбции протеолитических ферментов на сорбенте Purolite-C150.

Подобраны оптимальные условия ультрафильтрации, для концентрирования раствора протеолитических ферментов. Было достигнуто концентрирование в 5 раз.

Таким образом, была разработана технология получения протеолитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя. Данная технология может применяться на уже существующих предприятиях для восполнения недостатка сырья, а также может стать основой для создания нового предприятия в районах с развитым оленеводством.

Литература:

1. Чикалев А.И. Оленеводство: Учебник /Чикалев А.И., Юлдашбаев Ю.А., Родионов Г.В. - М.: КУРС, НИЦ ИНФРА-М, 2015. – 100 С.
2. Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. / J. Gen. Physiol. / 1974. P. 291-300.
3. Lowry, O.H. Protein measurement with Folinphenol reagent / N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193.No1. – P. 265-275.

UDC 602:636.9

ISOLATION AND PURIFICATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES FROM THE PANCREAS OF A REINDEER.

Stuchaeva A.A., Karavaeva L.I. Glazova .N.V.

St. Petersburg University of Chemicals and Pharmaceutics, St. Petersburg, Russia
St. Petersburg, Prof. Popov St., 14, lit. A
e-mail: anna.stuchaeva@pharminnotech.com

The technology of isolation and purification of proteolytic enzymes from the pancreas of reindeer has been

developed. The extracts of the pancreas of reindeer and pancreas of cattle have been compared.

Key words: proteases, sorbents, ultrafiltration, cattle, reindeer.

Preparations containing proteolytic enzymes (Himopsin,000 "Samson-Med") are produced from the pancreas of cattle. Often the company has the lack of raw materials. At the same time, the pancreas of a reindeer is still not used on an industrial scale, although there is a sufficient amount of raw materials in the regions of the far North of Russia. Therefore, the urgent task is the development of technologies of isolation and purification of proteolytic enzymes from the pancreas of a reindeer.

The conditions of the extraction of proteolytic enzymes from the pancreas of a reindeer were selected, and the extracts from the pancreas of reindeer and cattle were also compared.

Proteases of the pancreas of cattle were shown to be contained in the form of inactive predecessors, but proteases of a reindeer were shown to be in active form.

To isolate and purify proteolytic enzymes from the obtained extract, the optimal sorbent was selected. The best sorbent was Purolite-C150, as in the sorption-chromatographic isolation of the protease complex at which the maximum yield was achieved. The output curve of the sorption and desorption of proteolytic enzymes on protein and on activity [2,3] on the optimal sorbent is shown in figure 1.

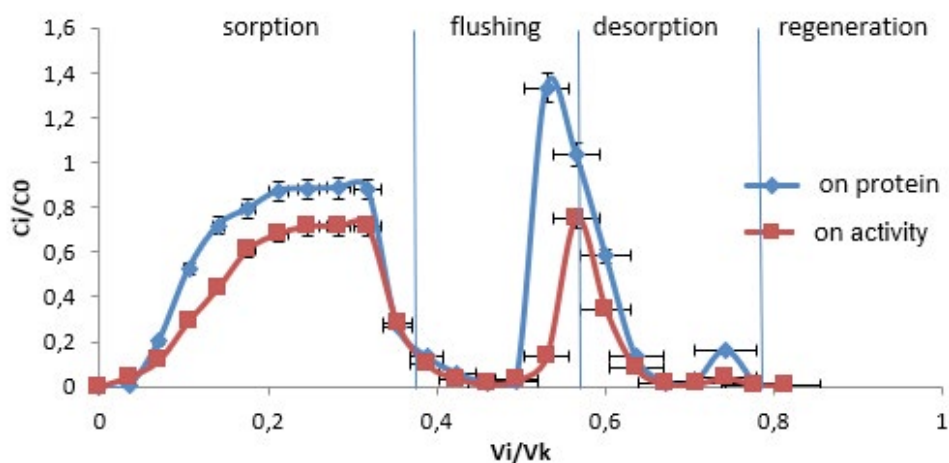


Fig. 1. The output curve of sorption and desorption of proteolytic enzymes on the sorbent Purolite-C150.

The optimal conditions of ultrafiltration for concentration of proteolytic enzyme solution were found. Concentration was achieved 5 times. Thus, the technology of obtaining proteolytic enzymes from the pancreas of reindeer was developed. This technology can be used in existing enterprises to fill the shortage of raw materials, and it can also become the basis for the creation of a new enterprise in areas with developed reindeer husbandry.

References:

1. Chikalev A.I. Reindeer breeding: Textbook // Chikalev, A.I., Yuldashbaev, Yu.A., Rodionov, G.V. - M: KURS, SIC INFRA-M, 2015. - 100 P.
2. Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor.// J. Gen. Physiol./ 1974. P. 291-300.
3. Lowry, O.H. Protein measurement with Folinphenol reagent // N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. - 1951. - V. 193.No1. - P. 265-275.

УДК 615.45

ГИБРИДНЫЕ АЭРОГЕЛИ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИКИ И МЕДИЦИНЫ

Меньшутина Н.В., Гусева Е.В.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1
e-mail: chemcom@muctr.ru

В данной работе рассмотрены материалы нового поколения – гибридные аэрогели, которые находят широкое применение в различных областях фармацевтики и медицины.

Ключевые слова: аэрогели, гибридные аэрогели, фармацевтика, медицина

Аэрогели – это материалы 21 века, обладающие уникальными свойствами: большой пористостью, высокой внутренней площадью поверхности (200-1000 м²/г), наличием мезопор, полным отсутствием остаточного содержания вредных растворителей, что крайне важно для фармацевтики и медицины.

Особый интерес представляют гибридные аэрогели, состоящие из разных химических соединений: органических и неорганических. Они могут быть в форме монолитов, порошков, сфер. Аэрогели могут быть использованы в качестве:

- системы доставки лекарств (в двух формах: твердой и газообразной);
- матриц для роста различного рода клеток;
- сорбентов жидкостей (губки) и газов [1].

Аэрогели, в поры которых с помощью специальных технологий адсорбируются или вкладываются активные труднорастворимые фармацевтические вещества [2], представляют большой интерес для варьирования фармакокинетики или увеличения скорости высвобождения твердых фармацевтических композиций. Биоорганические аэрогели в виде микрочастиц размером 1-5 мкм перспективно использовать в ингаляторных формах. Легкие частицы, содержащие активное фармацевтическое вещество, можно использовать для назального применения или лечения бронхиальных и легочных заболеваний.

Проводятся исследования для использования аэрогелей как клеточных матриц для замены костной ткани, для восстановления кожных покровов. Аэрогели, наполненные углеродными нанотрубками, позволяют проводить электрические сигналы [3], и, следовательно, могут быть использованы в различных имплантах.

Как пористое тело, аэрогели обладают высокой степенью сорбции жидкостей и газов, что было подтверждено испытаниями на животных, и находит свое применение в медицине катастроф.

Литература:

1. Меньшутина Н.В., Смирнова И.В., Гуриков П.А. Аэрогели – новые наноструктурированные материалы: получение, свойства и биомедицинское применение. Учебное пособие. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2012. – 60с.
2. Ловская Д.Д. Процессы получения органических аэрогелей на основе альгината натрия и композиций на их основе: дисс.... канд. техн. наук: 05 – М., 2017. – 229с.
3. Цыганков П.Ю. Процессы получения аэрогелей с внедрёнными углеродными нанотрубками в аппаратах высокого давления и их интенсификация: дисс.... канд. техн. наук: 05 – М., 2018. – 191с.

UDC 615.45

HIBRID AEROGELS FOR PHARMACEUTICS AND MEDICINE

Menshutina N.V., Guseva E.V.

*D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
125047, Moscow, Miusskaya sq, 9
e-mail: chemcom@muctr.ru*

In this paper the materials of a new generation - hybrid aerogels have been considered. These materials are widely used in various fields of pharmaceuticals and medicine.

Key words: aerogels, hybrid aerogels, pharmaceuticals, medicine/

Aerogels are materials of the 21st century with unique properties: high porosity, high internal surface area (200-1000 m² / g), presence of mesopores, complete absence of residual content of harmful solvents, which is extremely important for pharmaceuticals and medicine.

Of particular interest are hybrid aerogels consisting of various chemical compounds: organic and inorganic. They can be in the form of monoliths, powders, spheres. Aerogels can be used as:

- drug delivery systems (in two forms: solid and gaseous);
- matrices for the growth of various types of cells;
- sorbents of liquids (sponges) and gases [1].

Aerogels, in the pores of which, using special technologies, poorly soluble pharmaceutical substances are adsorbed or embedded [2], are of great interest for varying pharmacokinetics or increasing the release rate of solid pharmaceutical compositions. Bioorganic aerogels in the form of microparticles with a size of 1-5 microns are

promising to be used in inhalation forms. Light particles containing the active pharmaceutical substance can be used for nasal application or treatment of bronchial and pulmonary diseases.

The studies are conducted on the use of aerogels as cellular matrices for bone replacement, for skin restoration. Aerogels filled with carbon nanotubes make it possible to conduct electrical signals [3], and, therefore, can be used in various implants.

As a porous body, aerogels have a high degree of sorption of liquids and gases, which was confirmed by animal tests, and finds its application in disaster medicine.

References:

1. Menshutina N.V., Smirnova I.V., Gurikov P.A. Aerogels are new nanostructured materials: production, properties and biomedical applications. Tutorial/ Published by MUCTR. – 2012. – P.60.
2. Lovskaya D.D. Processes of organic aerogels production based on sodium alginate and compositions based on them: doctoral thesis: 05.17.08. – MUCTR, 2017. – 229p.
3. Tsygankov P.Ju. Processes of aerogels with embedded carbon nanotubes production in high-pressure apparatuses and their intensification: doctoral thesis: 05.17.08. – MUCTR, 2018. – 191p.

УДК: 615.593.47.18

ИНАКТИВАЦИЯ БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ УСТАНОВКИ ГЕНЕРАТОРА ИМПУЛЬСОВ ВЫСОКОГО НАПРЯЖЕНИЯ

Красильников И.В., Петров С.В., Дубов О.В.

ФГУП Санкт-Петербургский институт вакцин и сывороток ФМБА России
198320, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, 52
e-mail: i.v.krasilnikov@spbniiivs.ru

Создана проточная установка, обеспечивающая инактивацию водных стоков от бактерий и вирусов с помощью прохождения обрабатываемой воды через разрядную камеру, в которой создается импульсный электрический коронный разряд.

Ключевые слова: генератор импульсов высокого напряжения, инактивация вирусов и бактерий

Известно, что импульсные электрические разряды способны разрушать патогенные микроорганизмы, вирусы, споры микроскопических грибов, а также очищать водные образцы от химических соединений. Эти результаты получены в разное время на импульсных электро-разрядных установках камерного типа. Такие установки не способны обрабатывать большие объемы воды в протоке. Кроме того, не способны к поддержанию в течение длительного времени (несколько часов и более) стабильного горения импульсного разряда, что влияет на процесс инактивации инфекционных агентов и деструкцию химических соединений.

Разработана лабораторная установка, в которой обеспечиваются стабильные условия для поддержки импульсного коронного разряда с разностью потенциалов в виде коротких импульсов с частотой, достигающей 50 кгц и амплитудой до 70 кВ.

Такая установка в циклическом режиме обеспечивает инактивацию вирусов и бактерий в объемах 50-100 литров воды в течение 5-7 минут.

На установке были получены данные об инактивации вирусов гриппа и пекарских дрожжей. Также была показана возможность при более «жестких» режимах проводить деструкцию ряда бактерий и микраструктур.

На базе имеющейся установки возможно создание модели с проточной камерой, когда жидкость поступает в разрядную камеру и, проходя вдоль нее, полностью обеззараживается.

Создание установки с проточной камерой позволит обеззараживать большие объемы водных отходов, а также сточные и питьевые воды (кубометры в мин), не прибегая к химическим методам обработки воды и сохранении энергоресурсов (по сравнению с обеззараживанием автоклавированием, ультрафильтрацией или обратным осмосом).

Установка может применяться также в биотехнологии для получения инактивированных препаратов дрожжей, бактерий, вирусов (производство вакцин), разрушения клеток штаммов-продуцентов и извлечения из них целевых продуктов (антигенов, ферментов, антител).

UDC: 615.593.47.18

INACTIVATION OF BACTERIA AND VIRUSES USING HIGH VOLTAGE PULSE GENERATOR PLANT

Krasilnikov I.V., Petrov S.V., Dubov O.V.

Federal State Unitary Enterprise St. Petersburg Institute of Vaccines and Sera, f FMBA of Russia
198320, St. Petersburg, Krasnoye Selo, ul. Svoboda, 52
e-mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

A flow-through installation was created to ensure the inactivation of water effluents from bacteria and viruses by passing treated water through a discharge chamber, in which a pulsed electrical corona discharge is created.

Key words: high voltage pulse generator, inactivation of viruses and bacteria

It is known that pulsed electrical discharges can destroy pathogenic microorganisms, viruses, spores of microscopic fungi, as well as purify water samples from chemical compounds. These results were obtained at different times on pulsed electro discharge chamber-type installations. Such plants are not able to handle large volumes of water in the duct. In addition, they are not capable of maintaining for a long time (several hours or more) stable burning of a pulsed discharge, which affects the process of inactivation of infectious agents and the destruction of chemical compounds.

A laboratory setup has been developed in which stable conditions are provided for the support of a pulsed corona discharge with a potential difference in the form of short pulses with a frequency reaching 50 kHz and an amplitude of up to 70 kV.

Such a setting in cyclic mode provides inactivation of viruses and bacteria in volumes of 50-100 liters of water for 5-7 minutes.

At the facility, data were obtained on the inactivation of influenza viruses and Baker's yeast. It was also shown that with more "hard" modes, it is possible to carry out the destruction of a number of bacteria and microstructures.

On the basis of the existing installation, it is possible to create a model with a flow chamber when the purified liquid enters the discharge chamber and, passing along it, is completely disinfected.

Creating an installation with a flow-through chamber will allow to disinfect large volumes of waste water, as well as waste and drinking water (cubic meters per minute), without resorting to chemical methods of water treatment and energy conservation (as compared to disinfection by autoclaving, ultrafiltration or reverse osmosis).

The installation can also be used in biotechnology to obtain inactivated preparations of yeast, bacteria, viruses (production of vaccines), destroy the cells- producent strains and extract from them target products (antigens, enzymes, antibodies).

УДК 606:577.151.5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

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 определению состава основных ферментов в экстракте поджелудочной железы северного оленя. Показана возможность получения панкреатических ферментов в активной форме экстракционным методом.

Ключевые слова: α-амилаза, протеаза, липаза, панкреатин, поджелудочная железа северного оленя.

Ферментное средство панкреатин, в состав которого входят панкреатические ферменты α-амилаза, протеазы, липаза, применяют для улучшения процесса пищеварения при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и в случаях погрешности питания [1]. На основе панкреатина изготавливают как лекар-

ственные препараты, так и биологически активные добавки.

По традиционной технологии панкреатин получали из экстракта поджелудочной железы крупного рогатого скота [2]. В настоящее время интерес представляет получение панкреатина из альтернативных источников сырья, в частности, поджелудочной железы северных оленей. Органы северного оленя могут выступать в качестве сырья в производстве различных биологически активных веществ в тех областях страны, для которых характерно наличие оленеводческих предприятий.

Целью данного исследования было определение состава основных ферментов в экстракте поджелудочной железы северного оленя – α -амилазы, протеаз и липазы.

За основу методики постановки эксперимента был принят традиционный способ получения панкреатина из поджелудочной железы КРС, представленный в патенте на изобретение 1979 г. [2]. Экстракцию комплекса ферментов α -амилазы, протеаз и липазы из предварительно измельченной поджелудочной железы проводили 0,5% уксусной кислотой (соотношение сырья:экстрагент составило 1:2) при температуре не выше +5°C.

Результаты экспериментов показали, что в составе экстракта присутствуют все исследуемые панкреатические ферменты в активной форме в количестве: α -амилаза – 223,30 ЕД/мл, протеазы – 1,44 ЕД/мл, липаза – 0,40 ЕД/мл. Однако, получены низкие значения удельной активности ферментов при достаточно высокой концентрации общего белка, что говорит о наличии белковых примесей в экстракте. Для повышения удельной активности ферментов необходимо использовать современные методы очистки белков, такие как сорбционно-хроматографическая очистка, мембранные технологии и др.

Таким образом, перспективной представляется разработка способа выделения и очистки панкреатина из поджелудочной железы северного оленя. На основе получаемой субстанции в дальнейшем можно будет создать лекарственный препарат или биологически активную добавку, не имеющие аналогов на российском рынке.

Литература:

1. Панкреатин [Электронный ресурс] / – URL: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/334001>
2. Способ получения панкреатина: описание изобретения к а. с. 651810 СССР, М. кл.2 А 61 К 35/12. / Л. Б. Полянская, Е. Ю. Куликова, В. М. Царенков, Я. М. Гинзбург, Т. Н. Бирульчик (СССР). – № 2520662/28-13; заявл. 19.08.77; опубл. 15.03.79, Бюл. № 10. – 2 с.

UDC 606:577.151.5

DETERMINATION OF ENZYME COMPLEX OF REINDEER PANCREAS

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 determination of the main enzymes composition in the extract of a reindeer pancreas are presented in this work. The possibility of obtaining pancreatic enzymes in the active form by the extraction method is shown.

Key words: α - amylase, protease, lipase, pancreatin, reindeer pancreas.

The pancreatin, which consists of pancreatic enzymes α -amylase, protease, lipase, is used to improve the digestive process in diseases of the gastrointestinal tract and in cases of food error [1]. Drugs and dietary supplements are made based on pancreatin.

According to the traditional technology, pancreatin was obtained from cattle pancreas extract [2]. Currently, it is of interest to obtain pancreatin from alternative sources, particularly, the pancreas of reindeer. Reindeer organs can act as sources in the production of various biologically active substances in those areas of the country that are characterized by the presence of reindeer enterprises.

The purpose of this study was to determine the composition of the main enzymes in the pancreatic extract of reindeer - α -amylase, proteases and lipase.

The methodology of the experiment was adopted from the traditional method of obtaining pancreatin from cattle pancreas, presented in the patent for invention in 1979 [2]. Extraction of the α -amylase, protease and lipase enzyme complex from pre-crushed pancreas was performed with 0.5% acetic acid (the ratio of pre-crushed

pancreas: extractant was 1:2) at a temperature not higher than + 5 ° C.

The experimental results showed that the extract contains all the investigated pancreatic enzymes in active form in the following amounts: α -amylase - 223.30 U/ml, protease - 1.44 U/ml, lipase - 0.40 U/ml. However, low values of specific activity of enzymes were obtained at a sufficiently high concentration of total protein, which indicates the presence of protein impurities in the extract. To increase the specific activity of enzymes, it is necessary to use modern methods of protein purification, such as sorption-chromatographic purification, membrane technologies, etc.

Thus, it seems promising to develop a method for isolating and purifying pancreatin from the reindeer pancreas. In the future it will be possible to create a drug or a biologically active supplement based on the substance obtained, that does not have analogues in the Russian market.

References:

1. Pancreatin [Electronic resource]/ URL: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/334001>
2. Sposob polucheniya pankreatina: opisaniye izobreteniya k a. s. 651810 USSR, M. kl.2 A 61 K 35/12. / L. B. Polyanskaya, E. U. Kulikova, V. M. Tsarenkov, Y. M. Ginzburg, T. N. Birulchik (USSR). – № 2520662/28-13; st. 19.08.77; pub. 15.03.79, Bul. № 10. – 2 p.

УДК 57.085.23

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ БИОМАССЫ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК *PANAX JAPONICUS* И *DIOSCOREA DELTOIDEA*

Титова М. В.^{1,2}, Шумило Н. А.¹, Иванов И. М.¹, Ключин А. Г.¹, Кочкин Д. В.^{1,2}, Куликова А. С.¹, Фоменков А. А.¹, Носов А. М.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия
127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

² Биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

e-mail: titomirez@mail.ru

Отработана технология производства лекарственного растительного сырья для специализированных продуктов питания, косметики, кормов, лекарственных препаратов на основе биомассы суспензионных культур клеток *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea*, культивируемых в промышленных барботажных биореакторах.

Ключевые слова: суспензионная культура растительных клеток, биологически активные вещества, *Panax japonicus*, *Dioscorea deltoidea*, фураностаноловые гликозиды, гинзенозиды.

Для суспензионных культур клеток лекарственных растений *Dioscorea deltoidea* и *Panax japonicus* была отработана технология длительного непрерывного полупроточного выращивания в промышленных биореакторах. В соответствии с отработанной методикой, процессы культивирования при постоянном контроле технологических параметров повторяли многократно, показаны стабильность и воспроизводимость физиологических показателей используемых штаммов.

С использованием методов ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, ИСП-МС для получаемой клеточной биомассы подтверждено присутствие жизненно необходимых для человека макро- и микроэлементов в безопасных концентрациях, а также целевых биологически активных веществ изопреноидной природы (для *Panax japonicus* общее содержание гинзенозидов в среднем 2–6 % к сухой массе клеток, для *Dioscorea deltoidea* общее содержание фураностаноловых гликозидов – 3–7% к сухой массе клеток (Khandy et al., 2016; Kochkin et al., 2016)). Показано, что при этом в сравнении с классическим методом периодического культивирования общая продуктивность процесса повышается в среднем на 15–20% за счет отсутствия лаг фазы и времени, необходимого на подготовку и перезагрузку оборудования. Предложенная технология может быть использована для экологически чистого крупномасштабного производственного выращивания, на ее основе

разработаны технологические регламенты и ТУ (Титова с соавт., 2015).

Согласно результатам проведенных в ВНИИМП им. Горбатова испытаний на острую токсичность и аллергенность, получаемую клеточную биомассу можно отнести по ГОСТ 32644 к веществам малоопасным и малотоксичным, она может быть рекомендована для использования в функциональных и специализированных продуктах питания, косметике, а также при изготовлении кормов, кормовых добавок, лекарственных препаратов. Для коммерциализации полученных результатов активизирована работа созданного на базе ИФР РАН ООО «Циторесурс», а также налажены контакты с производителем нутрицевтиков широкого спектра действия ЗАО «Биофармос» (С.-Петербург).

В работе было использовано оборудование УНУ «Опытный биотехнологический комплекс» ИФР РАН.

Литература:

1. Титова М. В., Шумило Н. А., Решетняк О. В., Глаголева Е. С., Носов А. М. Физиологические характеристики суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* при масштабировании процесса выращивания // Биотехнология. — 2015. — №3. — С. 71–80.
2. Khandy M. T., Titova M. V., Konstantinova S. V., Kochkin D. V., Ivanov I. M., Nosov A. M. Formation of Protodioscin and Deltoside Isomers in Suspension Cultures of Nepal Yam (*Dioscorea deltoidea* Wall.) Cells // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2016. — Vol. 52, No. 6. — P. 657–662.
3. Kochkin D. V., Khandy M. T., Zaitsev G. P., Tolkacheva N. V., Shashkov A. S., Titova M. V., Chirva V. Ya, Nosov A. M. Protodioscin in *Dioscorea deltoidea* Suspension Cell Culture // Chemistry of Natural Compounds. — 2016. — Vol. 52, no. 4. — P. 664–668.

UDC 57.085.23

OPTIMIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES PRODUCTION INDUSTRIAL TECHNOLOGY BASED ON PANAX JAPONICUS AND DIOSCOREA DELTOIDEA CELL SUSPENSION CULTURES

Titova M. V.^{1,2}, Shumilo N. A.¹, Иванов И. М.¹, Ключин А. Г.¹, Кочкин Д. В.^{1,2}, Куликова А. С.¹, Фоменков А. А.¹, Носов А. М.^{1,2}

¹ Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia
127276, Moscow, 35 Botanicheskaya str.

² Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia
119234, Moscow, 1-12 Lenin Hills
e-mail: titomirez@mail.ru

A technology, based on cultivated in industrial bubbling bioreactors cell suspension cultures of *Panax japonicus* and *Dioscorea deltoidea*, has been developed for the production of biologically active substances for specialized food products, cosmetics, feed, drugs.

Key words: plant cell suspension cultures, biologically active substances, *Panax japonicus*, *Dioscorea deltoidea*, furostanol glycosides, ginsenosides.

For cell suspension cultures of medicinal plants *Dioscorea deltoidea* and *Panax japonicus*, the technology of long-term continuous semi-flowing growth in industrial bioreactors was developed. In accordance with the methodology, the cultivation processes with constant monitoring of technological parameters were repeated many times, showing the stability and reproducibility of the physiological parameters of the strains.

Using the methods of HPLC, HPLC-MS, ICP-MS, the presence of vital for humans macro- and microelements in safe concentrations, as well as target biologically active substances of isoprenoid nature, was confirmed for the obtained cellular biomass (for *Panax japonicus* the total content of ginsenosides varied in the range of 2–6 % of dry cells mass, for *Dioscorea deltoidea* the total content of furostanol glycosides varied in the range of 3–7% of dry cells mass (Khandy *et al.*, 2016; Kochkin *et al.*, 2016)). It was shown that in comparison with the classical method of periodic cultivation, the overall productivity of the process increased on average by 15–20% due to the absence of the lag phase and the time required for the preparation and reloading of equipment. Based on proven technology technological regulations and specifications for environmentally friendly large-scale production cultivation were developed (Titova *et al.*, 2015).

According to the results of tests on toxicity and allergenicity (Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences), the obtained biomass of plant cells can be attributed according to

GOST 32644 to low hazard and low toxicity substances. Hence it can be recommended for use in functional and specialized foods, cosmetics, as well as in the manufacture of feed, drugs. For the commercialization of the obtained results, the work of LLC "Cytoresource", created on the basis of Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS (IPP RAS), was intensified, as well as contacts were established with the manufacturer of nutraceuticals with a wide range of activities "Biofarmos" (St. Petersburg).

In this work the equipment of Experimental Biotechnological Complex IPP RAS was used.

References:

1. Titova M. V., Shumilo N. A., Reshetnyak O. V., Glagoleva E. S., Nosov A. M. Physiological Characteristics of *Panax japonicus* Suspension Cell Culture during Growth Scaling-up // *Biotechnology*. — 2015. — №3. — С. 71–80.
2. Khandy M. T., Titova M. V., Konstantinova S. V., Kochkin D. V., Ivanov I. M., Nosov A. M. Formation of Protodioscin and Deltoside Isomers in Suspension Cultures of Nepal Yam (*Dioscorea deltoidea* Wall.) Cells // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2016. — Vol. 52, No. 6. — P. 657–662.
3. Kochkin D. V., Khandy M. T., Zaitsev G. P., Tolkacheva N. V., Shashkov A. S., Titova M. V., Chirva V. Ya, Nosov A. M. Protodioscin in *Dioscorea deltoidea* Suspension Cell Culture // *Chemistry of Natural Compounds*. — 2016. — Vol. 52, no. 4. — P. 664–668.

УДК 576.533+633.8+577.13+ 604.4

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *VITEX AGNUS-CASTUS* В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ

Володина Е. В.¹, Володина С. О.², Топкова О.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения РФ

197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

167982, Сыктывкар, ГСП-2, ул. Коммунистическая, 28

e-mail: lvodod28@gmail.com

Работа посвящена изучению процессов каллусогенеза *Vitex agnus-castus* в условиях *in vitro*. Показана способность каллусной культуры клеток к биосинтезу экдистероидов.

Ключевые слова: *Vitex agnus-castus*, каллусная культура клеток, фитоэкдистероиды

В настоящее время особую остроту приобретает проблема профессионального долголетия и улучшения качества жизни людей. В этом отношении показана большая перспектива использования в восстановительной медицине, гериатрии и спорте адаптогенов, относящихся к классу фитоэкдистероидов и представляющих собой полигидроксильированные стеринны, структурно подобные или идентичные гормонам линьки насекомых [1]. Ранее было показано, что экдистероиды более характерны растениям южных флор. Например, высокое содержание экдистероидов было обнаружено в древесных растениях рода *Vitex* L. (Lamiaceae), распространенных, главным образом, в субтропиках, тропиках и реже в умеренном поясе [2]. На территории бывшего СССР описан единственный вид этого рода – витекс священный (*Vitex agnus-castus* L.), который встречается на Черноморском побережье Кавказа, в Закавказье, Крыму и Средней Азии. Занесен в Красную книгу. Плоды и листья включены в Европейскую фармакопею. Деревья этого вида интродуцированы и могут выращиваться в южных регионах России [3]. Биотехнологии, основанные на культурах клеток *in vitro*, имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционным культивированием лекарственного сырья.

Нами были обнаружены места произрастания и собраны семена витекса священного в горной части Адлеровского района г. Сочи на Черноморском побережье Кавказа. Получена быстрорастущая каллусная культура клеток *Vitex agnus-castus*. Изучено влияние гормонального состава питательной среды и типа экспланта на процессы каллусогенеза в культуре *in vitro*. Показано, что максимальная частота индукции быстрорастущего каллуса наблюдалась при использовании среды Мурасиге и Скуга с добавлением 2,4Д (1,5 мг/мл) и БАП (0,2 мг/мл). Более интенсивное каллусообразование наблюдалось при использовании в качестве экспланта сегментов листа. Показана способность клеточной культуры к биосинтезу экдистероидов.

Исследования выполнены по теме НИР Гр № АААА-А17-117121270025-1.

Литература:

1. Фитоэкдистероиды / Под ред. В.В. Володина. – СПб.: Наука, 2003. – 293 с.
2. Володин В. В. Экдистероидсодержащие растения национального парка Кук Фьонг (Северный Вьетнам) / В. В. Володин, Л. Ву Тхи, С. О. Володина, А. Н. Кузнецов // Известия Коми НЦ УрО РАН. – 2018. – Т. 3, № 35. – С. 46–53.
3. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, и их химический состав, использование; Семейства Hippuridaceae–Lobeliaceae / Под ред. П.Д. Соколова. – СПб.: Наука, 1991. – С. 9.

UDC 576.533+633.8+577.13+ 604.4

OBTAINING CALLUS CULTURE OF VITEX AGNUS-CASTUS CELLS AS A PRODUCER FOR BIOTECHNOLOGICAL OBTAINING OF PHYTOECDYSTEROIDS

Volodina E.V.¹, Volodina S. O.², Topkova O.V.¹

¹ FSEI of HE "Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University" Russian Federation Ministry of Health 197376, St. Petersburg, street Prof. Popov, building 14, let. A

² Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences 167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya street, 28
e-mail: lvod28@gmail.com

The work is devoted to the study of the processes of callusogenesis of *Vitex agnus-castus* in vitro. The ability of callus cell culture to biosynthesis of ecdysteroids is shown.

Key words: *Vitex agnus-castus*, callus cell culture, phytoecdysteroids

Currently, the problem of professional longevity and improvement of the quality of life of people is becoming especially acute. In this regard, there is a great prospect of using adaptogens belonging to the class of phytoecdysteroids and representing polyhydroxylated sterols, structurally similar or identical to the hormones of insects, in restorative medicine, geriatrics and sports [1]. Earlier it was shown that ecdysteroids are more characteristic of plants of southern floras. For example, a high content of ecdysteroids was found in woody plants of the genus *Vitex* L. (Lamiaceae), distributed mainly in the subtropics, the tropics and less often in the temperate zone [2]. On the territory of the former USSR, the only species of this genus is described – the *Vitex* Sacred (*Vitex agnus-castus* L.), which is found on the Black Sea coast of the Caucasus, Transcaucasia, the Crimea and Central Asia. Fruits and leaves are included in the European Pharmacopoeia. Trees of this species are introduced and can be grown in the southern regions of Russia [3]. Biotechnologies based on cell culture in vitro have several advantages compared with the traditional cultivation of medicinal raw materials.

We have found growing places and collected seeds of *Vitex* sacred in the mountainous part of the Adler district of the city of Sochi on the Black Sea coast of the Caucasus. A fast-growing callus cell culture of *Vitex agnus-castus* was obtained. The influence of the hormonal composition of the nutrient medium and the type of explant on the processes of callusogenesis in culture in vitro was studied. It was shown that the maximum frequency of induction of fast-growing callus was observed when using Murashige and Skoog medium with the addition of 2.4 D (1.5 mg / ml) and BAP (0.2 mg / ml). More intensive callus formation was observed when using leaf segments as an explant. The ability of cell culture to biosynthesis of ecdysteroids is shown.

Studies have been carried out on the topic of research work. Gr. № AAAA-A17-117121270025-1.

References:

1. Phytoecdysteroids / Edited by V.V. Volodin. – SPb.: Science, 2003. – p. 293
2. Volodin V.V. Ecdysteroid-containing plants of the Cuc Phuong National Park (North Vietnam) / V.V. Volodin, L. Vu Thi, S.O. Volodina, A.N. Kuznetsov // Komi Science Center Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. – 2018. – Vol. 3, № 35. – p. 46–53.
3. Plant resources of the USSR: Flowering plants, and their chemical composition, use; Families Hippuridaceae – Lobeliaceae / Ed. Pd Sokolova. – SPb.: Science, 1991. – p. 9.

УДК 66.083.2

ПРОЦЕСС ПОЛУЧЕНИЯ АЭРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗАМЕНЫ РАСТВОРИТЕЛЯ ПОД ДАВЛЕНИЕМ

Лебедев А.Е., Суслова Е.Н., Худеев И.И., Ловская Д.Д.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1
e-mail: qwerty@mail.ru

Проведены экспериментальные и теоретические исследования процесса получения аэрогелей на основе биополимеров с использованием замены растворителя под давлением. Предложены различные режимы проведения стадии замены растворителя под давлением, показаны преимущества применения данного способа.

Ключевые слова: аэрогель, сверхкритические технологии, замена растворителя

Аэрогели – это высокопористые наноструктурированные материалы, которые, в настоящее время, находят все больше применений. Они могут быть использованы как в качестве теплоизоляционных материалов, так и для разработки на их основе носителей активных фармацевтических веществ, медицинских изделий, пищевой продукции и продукции многих других отраслей промышленности [1]. Это обусловлено в первую очередь особенными свойствами аэрогелей, их развитой удельной поверхностью, низкой плотностью и высокой пористостью, а также тем, что они могут быть изготовлены из целого ряда исходных веществ различной природы. В настоящее время наибольший интерес с точки зрения расширения перспективы применения аэрогелей представляю собой аэрогели на основе биополимеров. Такие материалы, чаще всего, являются биосовместимыми и биodeградируемыми, что позволяет использовать их в медицине, фармацевтике и пищевой промышленности.

Процесс получения аэрогелей на основе биополимеров состоит из ряда стадий: получение геля в водной среде, замена растворителя, сверхкритическая сушка. При этом первая и последняя стадии в настоящее время являются уже достаточно изученными. Стадия замены растворителя занимает значительное количество времени, поэтому ее интенсификация является актуальной.

В работе предлагается новый способ замены растворителя в среде сверхкритического диоксида углерода под высоким давлением. Применение сверхкритического диоксида углерода, который отличается низкой вязкостью, высоким коэффициентом самодиффузии, позволяет значительно ускорить явления массопереноса при осуществлении процесса замены растворителя и, соответственно снизить его общее время. Указанный процесс рассматривается на примере получения аэрогелей на основе биополимера альгината натрия. Его получают в водной среде, замену растворителя проводят на изопропиловый спирт для последующей сверхкритической сушки. Таким образом, в работе теоретически, с применением литературных данных [2,3], изучается трехкомпонентная система «изопропиловый спирт – вода – диоксид углерода». При этом выявляется зависимость фазового равновесия указанной системы от давления и температуры: критические точки системы, количество фаз, их составы и плотности. На основании данного теоретического исследования выбирается ряд режимов замены растворителя, которые исследуются экспериментально. Для проведения экспериментальных исследований осуществляется модернизация существующей установки для сверхкритической сушки с целью реализации подачи изопропилового спирта непосредственно в аппарат под высоким давлением. В ходе экспериментальных исследований показано, что применение способа замены растворителя под давлением позволяет более чем в 5 раз сократить время процесса по сравнению с проведением замены растворителя при нормальных условиях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-38-00420.

Литература:

1. Aegerter M. A., Leventis N., Koebel M. *Aerogels Handbook*. New York: Springer. – 2011. – 932 P.
2. Adrian T. et al. High-pressure multiphase behaviour of ternary systems carbon dioxide–water–polar solvent: review and modeling with the Peng–Robinson equation of state // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 1998. – Vol. 12, No 3. – P. 185–221.
3. Wendland M., Hasse H., Maurer G. Multiphase high-pressure equilibria of carbon dioxide–water–isopropanol // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 1993. – Vol. 6, No 4. – P. 211–222.

UDC 66.083.2

PRODUCTION OF BIOBASED AEROGELS USING SOLVENT EXCHANGE UNDER HIGH PRESSURE

Lebedev A.E., Suslova E.N., Khudeev I.I., Lovskaya D.D.

*Mendeleev university of chemical technology of Russia, Moscow, Russia
125480, Moscow, Geroev Panfilovcev str.
e-mail: artem.evg.lebedev@gmail.com*

Experimental and theoretical studies of biobased aerogels production process using solvent exchange under high pressure is conducted. Various regimes for carrying out the solvent exchange stage are proposed. Advantages of using this method are shown.

Key words: aerogel, supercritical technologies, solvent exchange

Aerogels are highly porous nanostructured materials with a number of different applications. They can be used as heat-insulating materials and for developing on their basis carriers of active pharmaceutical substances, medical devices, food products and products of many other industries [1]. This is due to properties of aerogels, their specific surface area, low density and high porosity, as well as the fact that they can be obtained from a variety of materials of different nature. Currently, the greatest interest from the point of view of expanding aerogels application is aerogels based on biopolymers. Such materials, most often, are biocompatible and biodegradable, which will allow their use in medicine, pharmaceuticals and food industry.

The process of biopolymer aerogels production consists of several stages: preparation of gel in an aqueous medium, solvent exchange and supercritical drying. The first and last stages are now quite well studied. The solvent exchange stage takes a significant amount of time, so its intensification is relevant.

The paper proposes a new method of solvent exchange in supercritical carbon dioxide medium under high-pressure. The use of supercritical carbon dioxide, which is characterized by low viscosity, high self-diffusion coefficient, allows to significantly accelerate the mass transfer phenomena in the implementation of the solvent exchange process and, accordingly, reduce its total time. This process is considered on the example of obtaining aerogels based on sodium alginate biopolymer. It is produced in an aqueous medium, then the solvent within pores replaced by isopropyl alcohol for subsequent supercritical drying. Thus, theoretically, using the literature data [2, 3], a three-component system "isopropyl alcohol – water – carbon dioxide" is studied. This reveals the dependence of the phase equilibrium of the specified system on pressure and temperature: critical points of the system, the number of phases, their composition and density. Based on this theoretical study, a number of solvent exchange regimes are selected, which are studied experimentally. To carry out experimental studies, the existing supercritical drying setup is being upgraded in order to realize the supply of isopropyl alcohol directly to the apparatus under high pressure. In the course of experimental studies, it was shown that the use of solvent exchange under high pressure makes it possible to reduce the process time by more than 5 times as compared with carrying out solvent exchange under ambient conditions.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-38-00420.

References:

1. Aegerter M. A., Leventis N., Koebel M. *Aerogels Handbook*. New York: Springer. – 2011. – 932 P.
2. Adrian T. et al. High-pressure multiphase behaviour of ternary systems carbon dioxide–water–polar solvent: review and modeling with the Peng–Robinson equation of state // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 1998. – Vol. 12, No 3. – P. 185–221.
3. Wendland M., Hasse H., Maurer G. Multiphase high-pressure equilibria of carbon dioxide–water–isopropanol // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 1993. – Vol. 6, No 4. – P. 211–222.

УДК 66.083.4

РАЗРАБОТКА ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ БЫСТРОГО РАСШИРЕНИЯ РАСТВОРОВ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ФЛЮИДОВ

Лебедев Е.А., Митрофанов И.В.

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20
e-mail: e.a.lebedev@gmail.com

Создана лабораторная экспериментальная установка для получения субмикронных и наноразмерных частиц методом быстрого расширения растворов веществ в сверхкритическом диоксиде углерода, которые могут быть использованы для получения новых фармацевтических композиций. Представлена модель гидродинамики расширения сверхкритического флюида.

Ключевые слова: RESS; вычислительная гидродинамика; моделирование; субмикронные частицы; фармацевтические композиции.

Целью представленной работы является разработка процесса получения с использованием сверхкритического диоксида углерода (СКДУ) субмикронных и наноразмерных частиц активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) для создания новых фармацевтических композиций, обладающих повышенной биодоступностью. Разрабатываемый процесс основан на технологии быстрого расширения растворов веществ в сверхкритических флюидах (RESS). Преимуществами данной технологии, прежде всего, являются относительная простота аппаратного оснащения, необходимого для проведения процесса, и возможность получения субмикронных и даже наноразмерных частиц [1]. Также процесс может быть проведён без использования или с использованием незначительного количества органических растворителей, что снижает стоимость и повышает экологичность технологии.

В качестве сверхкритического флюида в работе использовался диоксид углерода. Его применение обосновано низкими значениями критических давления и температуры, нетоксичностью, достаточно низкой агрессивностью по отношению к конструкционным материалам и дешевизной [2]. Свойства СКДУ позволяют применять более простые конструктивные решения при создании технологического оборудования, чем, например, при использовании сверхкритических воды и бутана.

В рамках представленной работы была создана лабораторная установка, которая может эксплуатироваться в периодическом и полунепрерывном режимах. Полунепрерывный режим в дальнейшем может быть использован для проведения исследований, направленных на масштабирование процесса. На созданной установке были проведены эксперименты с использованием ибупрофена, аспирина и ментола. Ментол был выбран как потенциальный соразтворитель для повышения растворимости АФИ в сверхкритическом диоксиде углерода.

Исследование влияния параметров процесса на характеристики получаемых частиц проводилось с использованием методов компьютерного моделирования. Была создана модель процесса расширения сверхкритического флюида, учитывающая гидродинамические и термодинамические эффекты. Реализация модели проводилась в рамках вычислительной гидродинамики, использующей численные методы для решения уравнений модели. Для учёта турбулентных явлений были использованы различные модели, основанные на усреднении по Рейнольдсу. Благодаря созданной модели были исследованы профили скоростей, давления и температуры непрерывной фазы. Сопла использованных форсунок представляют собой аксиально направленные отверстия разного диаметра, расположенные на центральной оси. Каждая форсунка оснащена только одним отверстием. Результаты компьютерного моделирования показали отличия гидродинамических процессов для форсунок с разными диаметрами выходных отверстий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-38-00893.

Литература:

1. M. Türk, P. Hils, B. Helfgen, K. Schaber, H.-J. Martin, M.A. Wahl. Micronization of pharmaceutical substances by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents // J. Supercrit. Fluids. 2002. Vol. 22 (1). P. 75-84.

2. Чернышев А.К., Гумеров Ф.М., Цветинский Г.Н., Яруллин Р.С., Иванов С.В. Левин Б.В., Шафран М.И., Жилин И.Ф., Бесков А.Г., Чернышев К.А. Диоксид углерода. Свойства, улавливание (получение), применение. М. Изд. «Галлея-принт». 2013. 903 С.

UDK 66.083.4

PROCESS DEVELOPMENT FOR PRODUCING PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS BASED ON SUBMICRON PARTICLES UTILIZING RAPID EXPANSION OF SUPERCRITICAL SOLUTIONS

Lebedev E.A., Mitrofanov I.V.

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
125480, Moscow, Geroev Panfilovtsev str., 20
e-mail: e.a.lebedev@gmail.com

A laboratory experimental installation has been created for producing submicron and nanoscale particles utilizing rapid expansion of supercritical carbon dioxide solutions, which can be used to obtain new pharmaceutical formulations. A model describing supercritical fluid expansion hydrodynamics is presented, as well.

Key words: RESS; Computational Fluid Dynamics; simulation; submicron particles; pharmaceutical formulations.

The aim of the presented work is to develop a process for production of submicron and nanoscale particles of active pharmaceutical ingredients (API) using supercritical carbon dioxide to create new pharmaceutical formulations with enhanced bioavailability. The process being developed is based on the technology of rapid expansion of supercritical solutions (RESS). The advantages of this technology are, first of all, relative simplicity of the equipment necessary for carrying out the process, and possibility of obtaining submicron and even nanoscale particles [1]. The process can also be carried out without using at all or using a small amount of organic solvents, which reduces the cost and improves the environmental friendliness of the technology.

Carbon dioxide was used as the supercritical fluid. Its use is justified by low values of critical pressure and temperature, non-toxicity, rather low aggressiveness with respect to construction materials and low cost [2]. The properties of supercritical carbon dioxide make it possible to apply simpler design solutions when creating technological equipment comparing to, for example, supercritical water and butane.

In the framework of the presented work, a laboratory installation was created, which can be operated in periodic and semi-continuous modes. The semi-continuous mode can later be used to conduct research aimed at scaling the process. Experimental studies using ibuprofen, aspirin, and menthol were conducted using the developed installation. Menthol was chosen as a potential co-solvent to increase the solubility of APIs in supercritical carbon dioxide.

The study of the process parameters influence on the characteristics of the particles produced was carried out using computer simulation methods. A model of the expansion of supercritical fluid was created, taking into account hydrodynamic and thermodynamic effects. The implementation of the model was carried out within the framework of computational fluid dynamics, which utilizes numerical methods for solving model equations. Turbulent phenomena were considered using various models based on Reynolds averaging. Thanks to the model created, the profiles of velocity, pressure and temperature of the continuous phase were investigated. Outlet orifices of used nozzles, which have different diameters, are axially directed and located on the central axis. Each nozzle is equipped with only one orifice. The results of numerical simulations showed differences in hydrodynamics for different nozzles.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-38-00893.

References:

1. M. Türk, P. Hils, B. Helfgen, K. Schaber, H.-J. Martin, M.A. Wahl. Micronization of pharmaceutical substances by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents // J. Supercrit. Fluids. 2002. Vol. 22 (1). P. 75-84.
2. Chernyshev A.K., Gumerov F.M., Tsvetinskiy G.N., Yarullin P.S., Ivanov S.V. Levin B.V., Shafran M.I., Zhilin I.F., Beskov A.G., Chernyshev K.A. Диоксид углерода. Свойства, улавливание (получение), применение. М. Изд. «Галлея-принт». 2013. 903 с.

УДК 577.2.08

РАСШИРЕНИЕ СПЕКТРА АМПЛИФИКАЦИОННЫХ МЕТОДОВ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Лысенко Н.С., Фрейлихман О.А., Ваганова А.Н., Мирошникова Н.К., Михайлов Н.В., Вербов В.Н.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14
e-mail: natalia.lysenko95@gmail.com

Представлены результаты сравнительного анализа эффективности метода петлевой изотермической амплификации (LAMP) с методом ПЦР-РВ для детекции *Neisseria gonorrhoeae*.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация, LAMP, *Neisseria gonorrhoeae*, гонорея

Высокая распространенность инфекционных заболеваний представляет актуальную медико-социальную проблему. Решающее значение для обеспечения своевременной лабораторной диагностики приобретает разработка инновационных подходов к ней, обеспечивающих оперативность и точность исследований. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это широко известный подход к амплификации специфических нуклеотидных последовательностей. Альтернативным подходом к амплификации является разработанный в 2000 г. метод петлевой изотермической амплификации (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP). Перспективность применения данной технологии обусловлена рядом потенциальных преимуществ: амплификация осуществляется в изотермических условиях (при температуре 60-65 °С) с использованием четырех или шести праймеров, обеспечивающих высокую специфичность реакции. Метод LAMP успешно применяется в лабораторной диагностике патогенных для человека и животных микроорганизмов (*Mycobacterium spp.*, *Leptospira spp.*, *Salmonella spp.*, *Neisseria spp.* и др.) [1-4]. Однако спорным остается вопрос рациональности его применения ввиду высокой стоимости реагентов, сложности подбора праймеров, а также риска контаминации.

Целью исследования являлось сравнение метода LAMP с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации интеркалирующим агентом 1000 x SYBR Green I с помощью амплификатора CFX96 Touch Real-Time («BioRad Laboratories», США) с методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для детекции возбудителя гонореи – *Neisseria gonorrhoeae*. В качестве стандартов использовались последовательные десятикратные разведения ДНК типового штамма *N. gonorrhoeae* NCTC8375/ATCC19424 в диапазоне концентраций от 10 ГЭ/мл до 10⁶ ГЭ/мл. Специфической ДНК-мишенью являлся фрагмент псевдогена *porA*, кодирующего синтез белка наружной мембраны – порина. По результатам амплификации оценивались показатели порогового цикла амплификации C_t , а также аналитическая чувствительность метода (минимальное детектируемое количество копий ДНК в образце). Дополнительно было произведено сравнение стоимости реагентов для метода LAMP и ПЦР-РВ.

В результате амплификации методами LAMP и ПЦР-РВ детектировались все разведения – аналитическая чувствительность методов составила 10 ГЭ/мл ДНК *N. gonorrhoeae*. В случае метода ПЦР-РВ показатель порогового цикла амплификации C_t для концентрации 10⁶ ГЭ/мл ДНК *N. gonorrhoeae* составил 21, в то время как методом LAMP данная концентрация детектируется на 13 цикле. Полученные значения подтверждают возможность применения метода LAMP с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации для проведения ускоренной диагностики гонореи, однако стоимость реагентов для LAMP в несколько раз превышает стоимость реагентов для ПЦР-РВ. Основная часть стоимости LAMP приходится на обязательный компонент реакции – термостабильную *Bst* полимеразу, аналогов которой не выявлено. Для минимизации стоимости реакции, метод LAMP может быть осуществлен, минуя стадию выделения ДНК из клинического материала, поскольку на ход реакции не оказывают влияния биологические компоненты – ингибиторы. Более того, для проведения петлевой изотермической амплификации не требуется дорогостоящего оборудования – амплификатора. Метод LAMP проводится в условиях постоянной температуры, поэтому может быть осуществлен в приборах на базе термоблока или в водяной бане. Однако в настоящее время высокая стоимость реагентов, сложность подбора и конструирования нескольких пар специфических праймеров, а также риск контаминации сдерживают широкое применение метода LAMP в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний.

Литература:

1. WHO. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. November 2016. WHO/HTM/TB/2016.11.
2. Nathan I. M., Pasupathi R., Mohandass R. Development of real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) method for sensitive and rapid detection of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* // *Lett Appl Microbiol.* 2018.
3. Validation of a *Salmonella* loop-mediated isothermal amplification assay in animal food / K. J. Domesle [et al.] // *Int J Food Microbiol.* 2018. Vol. 264. P. 63-76.
4. A Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Serogroup Identification of *Neisseria meningitidis* in Cerebrospinal Fluid / D. Lee [et al.] // *Front Microbiol.* 2016. Vol. 6. 8 p.

UDC 577.2.08

EXPANDING THE RANGE OF AMPLIFICATION METHODS IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES

Lysenko N.S., Freylikhman O.A., Vaganova A.N., Miroshnikova N.K., Mikhailov N.V., Verbov V.N.
Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia
Mira str.14, Saint-Petersburg, Russia, 197101
e-mail: natalia.lysenko95@gmail.com

The results of a comparative analysis of the efficiency of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* are presented.

Key words: loop-mediated isothermal amplification, LAMP, *Neisseria gonorrhoeae*, gonorrhea

The high prevalence of infectious diseases is a significant medical and social problem. Development of innovative approaches for laboratory diagnostic is crucial for efficiency and accuracy of research. Polymerase chain reaction (PCR) is a widely known method used to amplify specific nucleotide sequences. Developed in 2000 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method is an alternative amplification technology. Due to a number of potential advantages such as isothermal amplification conditions (temperature is about 60-65 °C) and the use of four or six primers, providing high specificity of the amplification, application of this technology is very promising. The LAMP method is successfully used in the laboratory diagnostics of pathogenic microorganisms for humans and animals (*Mycobacterium* spp., *Leptospira* spp., *Salmonella* spp., *Neisseria* spp., etc.) [1-4]. However, the rationality of its use is still controversial due to the high cost of reagents, difficulty of primer selection, and the risk of contamination.

The aim of the research was to compare the LAMP method with fluorescent detection of amplification products with an intercalating agent 1000 x SYBR Green I using the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, USA) with real-time PCR (qPCR) for detection of the gonorrhea infectious agent - *Neisseria gonorrhoeae*. As standards, tenfold serial dilutions of the *N. gonorrhoeae* standard strain NCTC8375 / ATCC19424 DNA were used in the concentration range from 10 GE/ml to 10⁶ GE/ml. Fragment of the pseudogene *porA*, which encodes the protein synthesis of the outer membrane porin, used as the specific DNA target. The results of amplification were used to evaluate the parameters of the amplification threshold cycle C_t , as well as the analytical sensitivity of the method (the minimum detectable number of DNA copies in the sample). Additionally, a comparison of the cost of reagents for the LAMP and real-time PCR method was made.

As a result of amplification by LAMP and real-time PCR methods, all dilutions were detected – the analytical sensitivities of the methods were 10 GE/ml of *N. gonorrhoeae* DNA. In case of the real-time PCR method, the C_t amplification threshold cycle for a concentration of 10⁶ GE/ml of *N. gonorrhoeae* DNA was 21, while the LAMP method detected this concentration on the 13th cycle. Obtained data confirm the possibility of using LAMP method with fluorescent detection of amplification products for express diagnostics of gonorrhea. However, the cost of reagents for LAMP is several times higher than for the real-time PCR. Most of the cost of LAMP reaction depends on the obligatory component of the reaction – the thermostable *Bst* polymerase, which has no analogues. To minimize the cost of the reaction, the LAMP method can be carried out passing the stage of DNA extraction from clinical material, since biological components (inhibitors) do not affect the course of the reaction. Moreover, expensive thermocycler is not required for loop-mediated isothermal amplification. The LAMP method is carried out in conditions of constant temperature, therefore it can be carried out in devices based on a thermoblock or in a water bath. However, the high cost of reagents, the complexity of the selection and design of several pairs of specific primers, as well as the risk of contamination inhibit the widespread use of the LAMP method in the laboratory diagnosis of infectious diseases.

References:

1. WHO. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. November 2016. WHO/HTM/TB/2016.11.
2. Nathan I. M., Pasupathi R., Mohandass R. Development of real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) method for sensitive and rapid detection of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* // *Lett Appl Microbiol.* 2018.
3. Validation of a *Salmonella* loop-mediated isothermal amplification assay in animal food / K. J. Domesle [et al.] // *Int J Food Microbiol.* 2018. Vol. 264. P. 63-76.
4. A Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Serogroup Identification of *Neisseria meningitidis* in Cerebrospinal Fluid / D. Lee [et al.] // *Front Microbiol.* 2016. Vol. 6. 8 p.

УДК 579.26

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТАГЕНОМНЫЕ ПОДХОДЫ В ОЦЕНКЕ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ДОБЫЧИ НЕФТИ НА МОРСКИХ МЕСТОРОЖДЕНИЯХ

Раманкулов Е.М.

РГП «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Казахстан
010000, Астана, ул. Кургальжинское шоссе, 13/5
e-mail: ramanculov@biocenter.kz

Описан микробоценоз морской воды северного Каспия в районах добычи нефти. Обнаружены различия в составе микробоценозов воды морских месторождений и прибрежных месторождений.

Ключевые слова: метагеномный анализ, фило, бактерии, микробоценоз, нефтедеструкторы

В 2016 г. морская нефтедобыча составила почти 30% от общего объема мировой добычи нефти. Добыча на морском шельфе в 2016 году велась более чем в 50 различных странах и составила более 27 миллионов баррелей нефти [1].

Однако разливы нефти в результате аварий на с *Exxon Valdez* в 1989 г., в Мексиканском заливе в 2010 г. показали, что последствия аварий могут быть катастрофически непредсказуемыми. В 1985 на скважине №37 месторождения Тенгиз произошла небывалая техногенная катастрофа, которую сравнивают с чернobyльской трагедией 1986 года. Сравните цифры на Аляске в море вылилось 40,9 миллионов литров нефти, в Мексиканском заливе разлив нефти составил 492-627 тыс. т, на Тенгизе потери составили 3,4 млн. т нефти [2].

В настоящее время в северном Каспии осуществляется освоение Кашаганского месторождения нефти и газа. В связи с этим, актуальным является оценка влияния шельфовой добычи нефти на микробиом морской среды как наиболее чувствительный компонент биоценоза моря.

Проведены комплексные исследования с отбором проб морской воды на разном удалении от месторождения Кашаган и в зоне прибрежного месторождения Тенгиз с помощью метагеномных методов с использованием чипов высокой плотности [3].

В результате метагеномного анализа было обнаружено 8 филов, включая *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia* и др. В образцах, взятых в зоне влияния Кашагана состав и соотношение филов был сходным и относительно равномерным, с преобладанием фила цианобактерий. Таким образом, по данным метагеномного анализа точки отбора проб, находящиеся на разном удалении от Кашагана характеризуются типичным составом микробоценоза морской воды. Дальнейшие исследования позволят отследить изменения в микробиоме после ввода в эксплуатацию месторождения.

В образце, взятой из прибрежной зоны влияния месторождения Тенгиз соотношение филов сильно отличалось от всех остальных точек с преобладанием фила *Proteobacteria*, главным образом за счет *Gammaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria*.

Таким образом, современные метагеномные исследования позволяют с высокой степенью чувствительности отслеживать изменения микробиоценоза природных сред и могут быть использованы в биологическом мониторинге при оценке влияния нефтегазовых месторождений на морские экосистемы.

На основании способности морских бактериальных изолятов из фила протеобактерий деструктурировать нефть создана коллекция штаммов нефтедеструкторов. Для изучения возможных механизмов

биodeградации нефти было проведено полногеномное секвенирование *Rhodococcus erythropolis* DN1 (6 548 397 п.н., 6138 генов) и *Pseudomonas aeruginosa* strain KIB. (6 263 069 п.н., 6174 генов). При аннотации геномов были обнаружены гены, кодирующие ферменты, участвующие в биodeградации как ароматических, так и алифатических соединений, включая гидроксилазы, диоксигеназы и монооксигеназы.

Литература:

1. Состояние и перспективы освоения углеводородных ресурсов Арктического шельфа России // https://magazine.neftegaz.ru/index.php?option=com_content&task=view&id=634.
2. Gokova I.V. Economic and political consequences of the accident in the Gulf of Mexico in 2010 // <https://files.scienceforum.ru/pdf/2012/1036.pdf>
3. Новак С. Природа может отомстить // Caravan.kz (11 июня 2010).
4. Todd Z. DeSantis, Eoin L. et al / High-Density Universal 16S rRNA Microarray Analysis Reveals Broader Diversity than Typical Clone Library When Sampling the Environment // Microbial Ecology. – 2007. – Vol. 53(3). – P.371-383.

UDC 579.26

METAGENOMIC APPROACHES FOR BIOSAFETY RISK ASSESSMENT OF THE SHALE OIL EXTRACTION

Ramankulov E.M.

RSE "National Center for Biotechnology" Committee of Science, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Kazakhstan
010000, Astana, st. Kurgalzhinskoe highway, 13/5
e-mail: ramanculov@biocenter.kz

Microbiocenosis of the seawater of the northern Caspian in the areas of oil production is described. Differences were found in the composition of microbiocenoses of water from offshore fields and coastal fields.

Key words: metagenomic analysis, phyla, bacteria, microbiocenosis, oil destructors

In 2016, offshore oil production accounted for almost 30% of the total world oil production. In 2016, offshore production was conducted in more than 50 different countries and exceeded 27 million barrels of oil [1].

However, oil spills resulting from accidents with Exxon Valdez in 1989, in the Gulf of Mexico in 2010, showed that the consequences of accidents can be catastrophically unpredictable. In 1985, an unprecedented man-made disaster occurred at the well No. 37 of the Tengiz field, which is comparable to the 1986 Chernobyl tragedy. For comparison, 40.9 million liters of oil were spilled into the sea in Alaska. Oil spill in the Gulf of Mexico was 492-627 thousand tons, while Tengiz spin exceeded to 3.4 million tons of oil [2].

Currently, Kashagan oil and gas field is being developed in the northern Caspian. In this regard, assessment of the impacts of the shale oil extraction on Caspian Sea ecosystem and microbiota of the marine environment is highly topical.

We have conducted comprehensive studies of sea water samples taken at different distances from the Kashagan field and the coastal zone of the Tengiz field using metagenomic technique utilizing microarray technology [3].

Metagenomic analysis based on PhyloChip microarray, which categorizes over 50,000 taxa of known bacteria and archaeal organisms, showed that at different distances from the Kashagan field, which has not yet been put into operation, the composition of microbiome is typical and relatively uniform, with a predominance of the phylum *Cyanobacteria*. In a sample taken from the coastal zone near the actively operated Tengiz field, the ratio of phyla was very different from the other points with predominance of *Proteobacteria* phylum, mainly due to *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, known for their oil-degradation properties. It was shown that metagenomic studies allow a high degree of sensitivity to track changes in microbiocenosis of natural environments and can be used in environmental monitoring in the evaluation of the impact of oil and gas production on marine ecosystem.

Another important goal of this project was development of environmentally friendly and effective method of cleanup and recovery from a marine oil spill. A collection of bacterial strains with oil-degrading ability from the phylum *Proteobacteria* was created. Whole genome sequencing of *Rhodococcus erythropolis* (6,548,397 bp, 6138 genes) and *Pseudomonas aeruginosa* (6,263,069 bp, 6174 genes) was carried out to explore possible mechanisms of crude oil biodegradation. Annotation of the genomes has revealed multiple genes that encode enzymes involved in the biodegradation of both aromatic and aliphatic compounds including such enzyme classes as hydroxylases, dioxygenase and monooxygenases.

References:

1. The state and prospects of development of hydrocarbon resources of the Russian Arctic shelf // https://magazine.neftegaz.ru/index.php?Option=com_content&task=view&id=634.
2. Gokova I.V. Economic and political consequences of the accident in the Gulf of Mexico in 2010 // <https://files.scienceforum.ru/pdf/2012/1036.pdf>
3. Novak C. Nature can take revenge // Caravan.kz (June 11, 2010).
4. Todd Z. DeSantis, Eoin L. et al., High All-Density Universal 16S rRNA Microarray Analysis Reader Broaden Diversity of the Population. *Microbial Ecology*. - 2007. - Vol. 53 (3). - P.371-383.

УДК 577

ТЕХНОЛОГИЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БИОАНАЛИТОВ НА ПРИМЕРЕ IL-13 ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Прохорова М.В.

ООО «Мерк», 115054, Москва, Валовая 35,
e-mail: marina.prokhorova@merckgroup.com

С помощью технологии подсчета единичных молекул (SMC) компании MERCK и проприетарных 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 ≤ 1 пг / мл.

Более высокая чувствительность была достигнута с помощью технологии SMC, которая обеспечивает 140-кратное улучшение нижнего предела количественной оценки (LLOQ; пг / мл) 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.

UDC 577

ULTRA LOW BIOMARKER DETECTION EXEMPLIFIED BY IL-13 IN AUTOIMMUNE DISEASES

Prokhorova M.

LLC Merck, 115054, Moscow, Valovaya 35,
e-mail: marina.prokhorova@merckgroup.com

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.

Key words: ELISA, multiplexing, IL-13

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 ≤ 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: 577.113.(7+4):547.327

УЛУЧШЕННОЕ ПРОНИКНОВЕНИЕ В КЛЕТКИ НОВЫХ N-(СУЛЬФОНИЛ)-ФОСФОРАМИДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

А.Ш. Держалова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской Академии наук, Россия, 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8,
e-mail: alina.derzhalova@gmail.com

Новые олигодезоксинуклеотиды, полностью замещенные по межнуклеотидным положениям N-(1-бутансульфонил)-фосфорамидными и N (1-гексансульфонил)-фосфорамидными группами, значительно эффективнее проникают в клетки млекопитающих, чем немодифицированные олигодезоксинуклеотиды, как в отсутствие, так и в присутствии трансфекционного агента.

Ключевые слова: (антисенс) олигонуклеотиды; нуклеиновые кислоты; аналоги ДНК; проникновение в клетку; трансфекция

Производные ДНК с модифицированными фосфатными группами, такие как ДНК-тиофосфаты, нашли применение в медицине как антисмысловые терапевтические препараты. К этой же группе соединений

принадлежат N-(сульфонил)-фосфорамидные олигонуклеотиды. Ранее мы продемонстрировали, что реакция Штаудингера на твердой фазе может быть успешно использована для получения новых производных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих N-(p-толуолсульфонил)-фосфорамидные (тозилфосфорамидные) группы [1] и N-(метансульфонил)-фосфорамидные (мезилфосфорамидные) группы [2]. Недавно было показано, что мезильные олигодезоксинуклеотиды (μ -олигонуклеотиды), в частности, способны эффективно активировать РНКазу H, обладают большим сродством к РНК, более устойчивы к ферментативному гидролизу и проявляют антисмысловую активность выше, чем ДНК-тиофосфаты [3]. В данной работе мы изучили цитотоксичность и проникновение в клетки млекопитающих новых производных олигодезоксинуклеотидов, содержащих N-(1-бутансульфонил)-фосфорамидные (бузильные, β) и N-(1-гексансульфонил)-фосфорамидные (гезильные, h) группы.

С помощью МТТ-теста было показано, что мезильные, бузильные и гезильные олигонуклеотиды, как и контрольный олигодезоксинуклеотид, не проявляют цитотоксичности в концентрации до 50 мкМ. Способность модифицированных олигонуклеотидов проникать в клетки рака молочной железы MDA MB 231 была исследована с помощью конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии. Было показано, что бузильный и гезильный олигонуклеотиды обладают улучшенным проникновением в клетки линии MDA MB 231 по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом как в отсутствие трансфекционного агента, так и в комплексе с липофектамом 3000. При этом внутриклеточная локализация олигонуклеотида зависит от вида модификации, а количество интернализованного олигонуклеотида зависит от его концентрации и времени инкубации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 18-515-05007, 18-515-57006 и 18-29-08062) и Базового проекта ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (VI.62.1.3, 0309-2016-0005) «Терапевтические нуклеиновые кислоты». Синтез олигонуклеотидов выполнен при поддержке гранта РНФ № 17-44-07003. Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

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 // *Биоорган. Хим.* – 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 (мезилфосфорамидную) группу. // *Биоорган. Хим.* – 2017. – Т. 43. – № 6. – С. 644–649.
3. Miroshnichenko S. K., Patutina O. A., Burakova E. A., Chelobanov B. P., Fokina A. A., Vlassov V. V., Altman S., Zenkova M. A., Stetsenko D. A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2019. – Jan 8. pii: 201813376. doi: 10.1073/pnas.1813376116. [Epub ahead of print].

UDC: 577.113.(7+4):547.327

ENHANCED CELLULAR UPTAKE OF NOVEL N-(SULFONYL)-PHOSPHORAMIDATE OLIGONUCLEOTIDES

A. Derzhalova¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave., 8
e-mail: alina.derzhalova@gmail.com

New oligodeoxynucleotides fully substituted at internucleotidic positions by N-(1-butanefulfonyl)-phosphoramidate or N-(1-hexanesulfonyl)-phosphoramidate groups demonstrate much more efficient cellular uptake into mammalian cells than unmodified oligodeoxynucleotide either in the absence or in the presence of a transfection agent.

Key words: antisense oligonucleotide; nucleic acids; DNA analogue; cell uptake; transfection

DNA analogues with modified phosphate groups such as DNA phosphorothioates have found their application in medicine as antisense therapeutics. N-(sulfonyl)-phosphoramidate oligonucleotides also belong in this group of compounds. We have previously demonstrated that Staudinger reaction on solid phase could be successfully applied to obtain previously unknown oligodeoxyribonucleotide derivatives containing N-(p-toluenesulfonyl)-

phosphoramidate (tosyl) groups [1] and N-(methanesulfonyl)-phosphoramidate (mesyl) groups [2]. Recently, it has been shown that mesyl oligodeoxynucleotides (μ -oligonucleotides), in particular, are more resistant to enzymatic digestion, able to effectively recruit RNase H, show better affinity for RNA and exhibit higher antisense activity than DNA phosphorothioates [3]. In this work, we have studied the cytotoxicity and uptake into mammalian cells of new oligodeoxynucleotide derivatives containing N-(1-butanefulfonyl)-phosphoramidate (busyl, β) and N-(1-hexanesulfonyl)-phosphoramidate (hesyl, h) groups.

Using the MTT test, we have shown that either mesyl, busyl or hesyl oligonucleotides as well as control oligodeoxynucleotide exhibit no cytotoxicity up to 50 μ M concentration. The uptake of modified oligonucleotides into MDA MB 231 breast cancer cells has been investigated by confocal laser fluorescent microscopy. It has been demonstrated that the uptake of both busyl and hesyl oligonucleotides into MDA MB 231 cells have been significantly enhanced relative to unmodified oligodeoxynucleotide either in the absence of a transfection agent or in the presence of LipofectamineTM 3000. The intracellular distribution of the oligonucleotide depended on the type of modification, and the amount of internalized oligonucleotide depended on its concentration and incubation time.

This work was funded by Russian Foundation for Basic Research (grants Nos. 18-515-05007, 18-515-57006 and 18-29-08062) and partially by the Russian Government funded budget project VI.62.1.3, 0309-2016-0005 (2017–2020) "Therapeutic nucleic acids". Oligodeoxynucleotide synthesis was supported by Russian Science Foundation (grant No. 17-44-07003). The authors thank the Microscopic Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for granting access to its equipment.

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. Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A. New Oligodeoxynucleotide Derivatives Containing N-(Methanesulfonyl)-Phosphoramidate (Mesyl Phosphoramidate) Internucleotide Group. // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2017. – V. 43. – No. 6. – P. 664–668.
3. Miroshnichenko S. K., Patutina O. A., Burakova E. A., Chelobanov B. P., Fokina A. A., Vlassov V. V., Altman S., Zenkova M. A., Stetsenko D. A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 2019. - Jan 8. pii: 201813376. doi: 10.1073/pnas.1813376116. [Epub ahead of print].

УДК 663.15

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ASPERGILLUS ORYZAE НА ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Прасолова В.Н., Володина Е.В., Топкова О.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения РФ 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит.А
e-mail: valeriya.prasolova@spcpcu.ru

Проведено исследование, в ходе которого оптимизирован состав питательной среды для культивирования продуцента *Aspergillus oryzae*. Использование оптимизированной питательной среды позволило увеличить ферментативную активность кислой протеазы и α -амилазы. Добавление в питательную среду индуктора биосинтеза липаз – подсолнечного и виноградного масел приводит к увеличению липолитической активности в 6-6,5 раз.

Ключевые слова: продуцент, микромицет, амилаза, кислая протеаза, липаза, ферментные препараты, индуктор

В качестве объекта исследований использовали культуру микромицета *Aspergillus oryzae* штамм 55. Исходная питательная среда имела следующий состав: глюкоза – 3 %, крахмал – 3 %, кукурузный экстракт – 3 %, соевая мука – 2 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,2 %, CaCO_3 – 0,3 %. Культивирование продуцента проводили глубинным способом в колбах Эрленмейера объемом 750 мл при температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 72 часов. Посевным материалом служила суспензия спор культуры гриба, выросшая в пробирке на скошенном сусло-агаре. По окончании процесса определяли ферментативную активность кислой протеазы модифицированным методом Ансона, α -амилазу по ГОСТ Р 54330-2011. Липолитическую активность определяли титриметрически по количеству жирных кислот, которые образуются в результате гидролиза субстрата под действи-

ем липаз в нативном растворе [2, 3]. Оптимизацию состава питательной среды проводили с применением методов математического планирования эксперимента.

В результате проведенных экспериментов показана возможность замены крахмала на пшеничные отруби. Их использование в концентрации 5 % в питательной среде способствует увеличению выхода кислой протеазы более, чем в 2 раза, а амилазы на (60 ± 5) %. Также наблюдали положительное влияние фосфатов на активность ферментов. Наличие фосфата калия двузамещенного в концентрации 1% положительно влияет на биосинтез комплекса ферментов, увеличивая их количество на 30-50 % по сравнению с результатами, полученными на исходной питательной среде. Внесение сернокислого магния ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) в концентрации 0,1 % также способствовало увеличению синтеза кислой протеазы на (40 ± 5) % при сохранении амилазной активности на уровне контроля. Наличие в питательной среде сульфата железа ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) в концентрации 0,005 % привело к увеличению синтеза α -амилазы на (78 ± 5) % при сохранении активности кислой протеазы на уровне контроля. Оптимизированная питательная среда (ОПС) для культивирования *Aspergillus oryzae* штамм 55 имеет следующий состав (в весо-объемных %): глюкоза – 1, пшеничные отруби – 3, калия фосфат двузамещенный – 1,5, кукурузный экстракт – 3, соевая мука – 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,2, CaCO_3 – 0,3, FeSO_4 – 0,0025, MgSO_4 – 0,15.

Для увеличения активности липазы продуцента проведены исследования по добавлению столовых растительных масел в различных концентрациях в ОПС. При добавлении подсолнечного и виноградного масел в концентрации 2% активность липазы увеличивается в 6-6,5 раз по сравнению с контролем. Исследование состава масел по количеству жирных кислот показало, что подсолнечное и виноградное масла содержат в своем составе большее количество линолевой кислоты – 60 г и 58 г на 100 грамм масла соответственно, и именно они способствуют увеличению биосинтеза липазы. Можно предположить, что микромицет *Aspergillus oryzae* шт. 55 имеет специфичность по субстрату именно к жирным кислотам с двумя ненасыщенными связями в своей структуре.

Полученные экспериментальные данные далее могут быть использованы для разработки биотехнологии получения лечебных ферментных препаратов [4].

Литература:

1. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Изд. «Элеватор», 2010. – 168 с.
2. ГОСТ Р 54330-2011. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилазной активности.
3. Дженсон, Р. Липолитические ферменты. – М.: Издательство Мир, 1978. – 396 с.
4. Кучма, И.Ю. Ферментные препараты в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта // Провизор, 2009. № 7. – С. 4-8.

UDC 663.15

THE ENZYMATIC ACTIVITY OF ASPERGILLUS ORYZAE AT OPTIMIZED NUTRIENT MEDIA

Prasolova V.N., Volodina E.V., Topkova O.V.

FSEI of HE «Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University» Russian Federation Ministry of Health
197376, St-Petersburg, street Prof. Popov, building 14, let. A
e-mail: valeriya.prasolova@spcpcu.ru

A study was conducted in which the composition of the nutrient medium for the cultivation of the producer *Aspergillus oryzae* was optimized. The use of optimized nutrient medium allowed to increase the enzymatic activity of acid protease and α -amylase. Add in an optimized culture medium of the inducer of the biosynthesis of lipase – sunflower and grape oils leads to an increase in lipolytic activity in 6-6,5 times.

Key words: producer, micromycete, amylase, acid protease, lipase, enzyme preparations, inducer

The culture of micromycetes *Aspergillus oryzae* strain 55 was used as the object of research. The initial nutrient medium had the following composition: glucose – 3 %, starch – 3 %, corn extract – 3 %, soy flour – 2 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,2 %, CaCO_3 – 0,3 %. Cultivation of the producer was carried out by deep method in Erlenmeyer flasks of 750 ml at a temperature of (27 ± 1) °C for 72 hours. The seed material was the suspension of the spores of the mushroom culture, which grew in a test tube on a beveled wort-agar. At the end of the process, the enzymatic activity of acid protease was determined by modified Anson's method, α -amylase according to GOST R 54330-2011. Lipolytic ac-

tivity was determined titrimetrically by the amount of fatty acids that are formed as a result of substrate hydrolysis under the action of lipases in the native solution [2, 3]. Optimization of the nutrient medium composition was carried out using the methods of mathematical planning of the experiment.

As a result of the experiments, the possibility of replacing starch with wheat bran is shown. Their use in a concentration of 5 % in the nutrient medium increases the yield of acid protease more than 2 times, and amylase (60 ± 5) %. A positive effect of phosphates on enzyme activity was also observed. The presence of potassium phosphate bi-substituted in a concentration of 1% has a positive effect on the biosynthesis of the enzyme complex, increasing their number by 30-50% compared to the results obtained in the initial nutrient medium. The addition of magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) at a concentration of 0,1% also contributed to an increase in the synthesis of acid protease by (40 ± 5) % while maintaining amylolytic activity at the control level. The presence of iron sulfate ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) in the nutrient medium at a concentration of 0,005% led to an increase in the synthesis of α -amylase by (78 ± 5) % while maintaining the activity of acid protease at the control level. The optimized nutrient medium (ONM) for the cultivation of *Aspergillus oryzae* strain 55 has the following composition (in weight-volume %): glucose – 1, wheat bran – 3, potassium phosphate bi – substituted – 1,5, corn extract – 3, soy flour – 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,2, CaCO_3 – 0,3, FeSO_4 – 0,0025, MgSO_4 – 0,15.

To increase the activity of lipase producer conducted research on the addition of table vegetable oils in different concentrations in the ONM. When adding sunflower and grape seed oils in a concentration of 2% lipase activity increases by 6-6,5 times compared to the control. The study of the composition of oils by the number of fatty acids showed that sunflower and grape oils contain in their composition a greater amount of linoleic acid – 60 g and 58 g per 100 grams of oil, respectively, and they contribute to an increase in lipase biosynthesis. It can be assumed that the micromycete *Aspergillus oryzae* strain 55 has specificity for the substrate to fatty acids two unsaturated bonds in its structure.

The obtained experimental data can be further used for the development of biotechnology for the production of therapeutic enzyme preparations [4].

References:

1. Grachev, I. M., Krivova, A.Y. *The Technology of enzyme preparations*. – M.: Ed. "Elevator", 2010. – 168 p.
2. GOST R 54330-2011. *Enzyme preparations for the food industry. Methods for determination of amylolytic activity*.
3. Jensen, R. *Lipolytic enzymes*. – Moscow: Publishing House Mir, 1978. – 396p.
4. Kuchma, I. *Ferment preparations in the treatment of diseases of the gastrointestinal tract* // Provizor, 2009. № 7. – P. 4-8.

НАДЛЕЖАЩИЕ ПРАКТИКИ В РАЗРАБОТКЕ И ИССЛЕДОВАНИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ: ВОЗМОЖНОСТИ, ЭКСПЕРТИЗА И ВЫЗОВЫ (В УСЛОВИЯХ БЫСТРО МЕНЯЮЩЕГОСЯ МИРА)

DEVELOPMENT AND RESEARCH GOOD PRACTICE OF BIOTECHNOLOGICAL PHARMACIES - POSSIBILITIES, EXPERTISE AND CHALLENGES IN RAPIDLY CHANGING WORLD

1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВИРУСНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОИЗВЕДЕННЫХ ПО ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, Вассарайс Р.А., Чащинова Д.В., Шамонов Н.А., Стратонова Н.В., Хамитов Р.А.	288
MODERN APPROACHES TO VIRAL SAFETY OF DRUGS MANUFACTURED BY RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY IN MAMMALIAN CELLS, R.Vassarays, D. Chashchinova, N. Shamonov, N. Stratonova, R. Khamitov	288
2. ВЫПУСК ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ – ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ, Сорокина Т.С., Серегин Ю.А., Скрыпин В.И.	289
THE RELEASE OF INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCT- PROBLEMS AND SOLUTIONS, Sorokina T.S., Seregin Y.A., Skrypin V.I.	290
3. НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С АМИНАМИ ЧЕРЕЗ ФОСФАТНУЮ ГРУППУ, К.В.Клабенкова, Е.А.Буракова, Б.П.Челобанов, А.А.Фокина, Д.А.Стеценко	290
A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATES WITH AMINES VIA THE PHOSPHATE GROUP, K.Klabenkova, E.Burakova, B.Chelobanov, A.Fokina A.A, D.Stetsenko.....	292
4. ПОИСК И БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ АЛКАЛОФИЛЬНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОМИКОЗОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ, А.А. Баранова, И.А. Гаврюшина, Р.А. Габрия, А.Г. Дах.....	293
SEARCH AND BIOTECHNOLOGY OF PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM ALKALOPHILIC MICROMYCETES ACTIVE AGAINST PATHOGENS OF PNEUMOMYCOSIS WITH MULTIPLE RESISTANCE, A. Baranova, I. Gavryushina, R. Gabriya, A. Dakh	295
5. РАЗРАБОТКА БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ CD3/CD19 для ЛЕЧЕНИЯ В-КЛЕТОЧНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВОООБРАЗОВАНИЙ, П. Славный, С.Г. Аббасова, А.М. Азарова, Д. Маккаферти, Д.А. Потеряев и А.А. Пискунов ..	297
DEVELOPMENT OF CD3/CD19 BISPECIFIC ANTIBODIES FOR TREATMENT OF B-CELL MALIGNANCIES, P. Slavny, S.Abbasova, A.Azarova, J.McCafferty, D.Poteryaev, A.Piskunov	298
6. РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ПОМОЩИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ, Индейкина М.И., Годованный А.В., Бугрова А.Е., Казиева Л.Ш., Жученко М., Бржозовский А.Г., Кононихин А.С., Николаев Е.Н.	298
DEVELOPMENT OF AN APPROACH TO PRIMARY SCTRUCTURE ANALYSIS OF MONOCLONAL ANTIBODIES BY HIGH-RESOLUTION MASS-SPECTROMETRY, Indeikina M.I., Godovanny A.V., Bugrova A.E., Kazieva L.Sh., Zhuchenko M., Brzhozovsky A.G., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N.	300
7. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ, Исеркапов А.В., Фабричный И.П.....	301
MODERN TECHNOLOGIES OF RECOMBINANT PROTEINS PURIFICATION, Iserkapov A.V., Fabrichny I.P.	301
8. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ИМИГЛЮЦЕРАЗЫ БИОАНАЛОГИЧНОГО И РЕФЕРЕНТНОГО ПРЕПАРАТА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ, Дегтерев М.Б., Смолов М.А., Вишневский А.Ю., Шукуров Р.Р.	302
PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF AN ORIGINAL AND BIOSIMILAR IMIGLUCERASE BY MASS SPECTROMETRY METHODS, M.Degterev, M.Smolov, A.Vishnevskiy, R.Shukurov	303

УДК 57.088.1

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВИРУСНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОИЗВЕДЕННЫХ ПО ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Вассарайс Р.А., Чащинова Д.В., Шамонов Н.А., Стратонова Н.В., Хамитов Р.А.

ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», Вольгинский, Россия
601125, Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д.14
e-mail: vassarays@ibcgenerium.ru

Исследования вирусной безопасности, проведенные для рекомбинантных лекарственных препаратов «Глуразим», «Коагил–VII», производства АО «Генериум» продемонстрировали высокую степень вирусологической безопасности данных продуктов. Для указанных препаратов проведены испытания эффективности снижения вирусной нагрузки согласно рекомендациям, представленным в ICH Q5A [1] и требованиям ЕврАзЭС [2].

Ключевые слова: вирусы, валидация, инактивация

Вирусная контаминация является распространенной проблемой для всех препаратов, производимых по технологии рекомбинантной ДНК. Подобная контаминация может привести к серьезным рискам для конечных потребителей.

Источником вирусов и вирусоподобных частиц могут являться сами клеточные линии и сырье, используемое в процессе производства [1]. Тестирование вирусной нагрузки в конечном продукте, сырье и клеточной линии является недостаточным и неэффективным. Наряду с данными исследованиями должна быть изучена и оптимизирована технология производства лекарственного препарата в части зрения инактивации и удаления вирусов. Данный процесс включает в себя валидацию технологического процесса на отдельных стадиях в демасштабированном формате с использованием модельных вирусов.

Для доказательства вирусной безопасности лекарственных препаратов «Глуразим» и «Коагил–VII» на первом этапе нами были исследованы клеточные линии и культуральная жидкость на момент окончания процесса культивирования. Было показано, что клеточные линии содержат вирусоподобные частицы: вариант С согласно ICH Q5A, что характерно для клеток ВНК и СНО, в которых производятся данные продукты. Модельные вирусы для дальнейших исследований были выбраны исходя из варианта С.

На следующем этапе были исследованы различные стадии технологического процесса: нанофильтрация; инактивация детергентами; стадии хроматографической очистки. Все выбранные этапы показали свою высокую эффективность – суммарное снижение вирусной нагрузки $>10^{12}$ для каждого из продуктов. Таким образом, было показано, что для каждого из исследуемых продуктов расчетное содержание вирусных частиц составило менее одной на 1 млн. доз.

Указанные работы проведены на площадках компании ViruSure (г. Вена, Австрия) и Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Литература:

1. ICH Q5A: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell Lines of human or animal origin.
2. Проект правил проведения исследований биологических лекарственных средств на территории Евразийского экономического союза.

UDC 57.088.1

MODERN APPROACHES TO VIRAL SAFETY OF DRUGS MANUFACTURED BY RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY IN MAMMALIAN CELLS

R.Vassarays, D. Chashchinova, N. Shamonov, N. Stratonova, R. Khamitov

International Biotechnology Center Generium, Volginsky, Russia
601125, Vladimir region, Petushinsky district, Volginsky village, Vladimirskaia ul., 14
e-mail: vassarays@ibcgenerium.ru

Virus safety studies of the recombinant drugs "Glurasim", "Koagil-VII" produced by Generium JSC, demonstrated a high degree of virus safety of these products. Tests of the effectiveness of viral load reduction were carried out according to the recommendations presented in ICH Q5A [1] and the requirements of EEC [2].

Key words: virus, validation, inactivation

Viral contamination is a common problem for all drugs produced by recombinant DNA technology. Such contamination can lead to serious clinical risk.

The source of viruses and virus-like particles can be the cell lines themselves and the raw materials used in the production process [1]. Testing of viral load in a final product, raw materials and cell line is insufficient and ineffective. Inactivation and removal of viruses by the technology of the recombinant drugs production should also be studied and optimized. This includes validation of the downscaled process at individual stages using model viruses.

We studied the cell lines and end-process culture fluid for "Glurasim" and "Koagil-VII". We showed that the cell lines contain virus-like particles: case C according to ICH Q5A, which is typical for BHK and CHO cells. Based on these data, model viruses were selected for the next investigation.

Several stages of the technological process (nanofiltration; detergent inactivation; chromatographic purification steps) were studied. All selected stages showed their high efficiency with a total reduction factor more than 10^{12} . We showed that each of the products contained less than one viral particle per 1 million doses.

These works were carried out at ViruSure company (Vienna, Austria) and the Federal State Institute "National Research Center of Epidemiology and Microbiology" of the Ministry of Health of the Russian Federation

References:

1. ICH Q5A: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell Lines of human or animal origin.
2. Rules for conducting research of biological drugs in Eurasian Economic Union.

УДК 615.012

ВЫПУСК ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ – ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Сорокина Т.С., Серегин Ю.А., Скрыпин В.И.

ООО «Фармапарк», Москва, Россия.
117246, Москва, Научный проезд, д.8, стр.1
e-mail: sorokina@pharmapark.ru

Ключевые слова: выпуск серий для клинических исследований, уполномоченное лицо, фармразработка.

На сегодняшний день одним из актуальных вопросов выпуска готовой продукции для клинических исследований является оценка качества, эффективности и безопасности исследуемого лекарственного средства при условии отсутствия утвержденного регистрационного досье.

Ключевой фигурой в этом процессе является уполномоченное лицо, которое руководствуется существующей нормативной базой.

Осуществление процедуры выпуска каждой серий лекарственного препарата основывается на требованиях, заложенных в соответствующей документации: «Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза» (Приложение 13, Приложение 16), «Правила надлежащей производственной практики (GMP) (Приложение 13, Приложение 16), «Федеральный закон об обращении лекарственных средств №61-ФЗ от 31.03.2010».

Наряду с этим производство серий для клинических исследований обладает особой спецификой по сравнению с производством зарегистрированной продукции, например: спецификации на исходное сырье, первичные упаковочные материалы, промежуточные продукты, нерасфасованную и готовую продукцию подлежат периодической оценке и изменению согласно объему соответствующих знаний о продукте; могут быть использованы меньше масштабы; допускается отсутствие полной валидации технологических процессов; допускается отсутствие регламента (если технологические операции не повторяются) и т.д.

Таким образом, спецификации, технологические инструкции и досье на серию исследуемых лекарственных препаратов могут быть ограниченным по объему и изменяться в процессе их разработки, в связи с чем уполномоченное лицо сталкивается с проблемой эффективной и быстрой оценки всех изменений.

Показаны основные подходы к осуществлению процедуры выпуска серии для клинических исследований, исключающие возможные риски для пациентов, а также гарантирующие, что на результаты клинических исследований не повлияли недостаточные безопасность, качество или эффективность лекарственного препарата, являющиеся следствием его ненадлежащего производства.

УДК 615.012

THE RELEASE OF INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCT – PROBLEMS AND SOLUTIONS

Sorokina T.S., Seregin Y.A., Skrypin V.I.

Pharmapark LLC, Moscow, Russia.

117246, Moscow, Nauchnyy proyезд, d.8, str.1

e-mail: sorokina@pharmapark.ru

Key words: batch release for clinical trials, Qualified Person, pharmaceutical development.

Today, one of the topical questions raised upon the finished product release for clinical trials is the assessment of quality, efficacy and safety of the investigational medicinal product in the absence of an approved registration dossier.

The key figure in this process is the Qualified Person, who is guided by the existing regulatory documents.

The implementation of the release procedure for any drug batch is based on the requirements specified in the relevant documentation: "Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union" (Appendix 13, Appendix 16, "Rules of Good Manufacturing Practice (GMP) (Appendix 13, Appendix 16), "Federal Law on Circulation of Medicinal Products No.61-FZ of 03/31/2010."

Along with this, the investigational medicinal product has a certain specific features in compare to the production of registered products, for example: specifications for raw materials, primary packaging materials, intermediate products, bulk and finished products are subject to periodic evaluation and change according to the amount of relevant knowledge about the product; smaller scales may be used; lack of full validation of technological processes; no written technical regulation is allowed (if technological operations are not being repeated) and so on.

Thus, the specifications, technological instructions and dossiers for batches of investigational medicinal product may have incomplete volume, and they may evolve while the development process is undergoing, and therefore the Qualified Person is faced with the problem of effective and rapid assessment of all changes.

Certain main approaches to the procedure for the certification by a Qualified Person and batch release have been proposed that eliminate possible risks for patients, as well as ensure that the outcome from the clinical trials is not affected by insufficient safety, quality or efficacy of the drug produced in non-adequate conditions.

УДК: 577.113.(7+4), ББК: 24.239

НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С АМИНАМИ ЧЕРЕЗ ФОСФАТНУЮ ГРУППУ

К.В.Клабенкова, Е.А.Буракова, Б.П.Челобанов, А.А.Фокина, Д.А.Стеценко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, Россия, 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8, 8,

e-mail: klabakovakris@gmail.com

Разработан новый способ получения конъюгатов олигонуклеотидов с различными аминами через модифицированную фосфатную группу. Активированный эфир 4-карбоксибензолсульфонилазида вводили по 5'-концевому межнуклеотидному положению олигонуклеотида с помощью реакции Штаудингера в ходе твердофазного синтеза. После обработки аминами получали конъюгаты олигонуклеотидов, содержащие амидную связь.

Ключевые слова: пептидный конъюгат; антисмысловый (антисенс) олигонуклеотид; реакция Штаудингера; активированный эфир; амидная связь.

Производные олигонуклеотидов, полученные путем химической модификации, рассматриваются в настоящее время как перспективные терапевтические агенты, действующие по антисмысловому механизму. Наибольшее распространение получили производные олигонуклеотидов, модифицированные по фосфатной группе, в силу относительной простоты синтеза. Однако широкому внедрению терапевтических олигонуклеотидов в клиническую практику препятствует их слабое проникновение в клетки. Один из способов решения этой проблемы заключается в конъюгации олигонуклеотида с другими молекулами, способными улучшить проникновение в клетки, например, за счет введения положительно заряженных групп.

Ранее мы показали, что реакция Штаудингера между органическим азидом и межнуклеотидным фосфиттриэфиром может быть удобным способом химической модификации олигонуклеотидов [1]. В данной работе мы получили кристаллический пентафторфениловый эфир 4-карбоксибензолсульфазида **1** (рис. 1), с помощью которого в олигонуклеотид по реакции Штаудингера в ходе твердофазного синтеза может быть введена активированная карбоксильная группа. С использованием этого активированного эфира были синтезированы производные олигонуклеотидов с активированной карбоксильной группой на 5'-концевом межнуклеотидном фосфате. После обработки избытком соответствующего алкамина, удаления защитных групп и отщепления от полимерного носителя был с высоким выходом получен ряд конъюгатов олигонуклеотидов с различными первичными аминами, содержащих амидную связь (рис. 1).

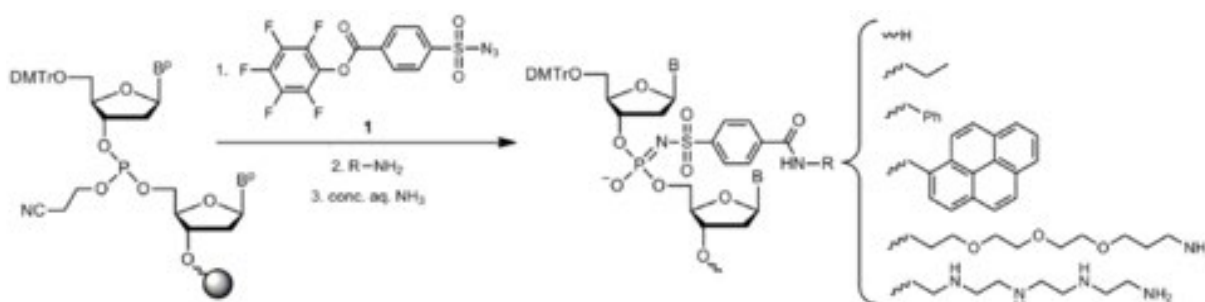


Рис. 1. Получение конъюгатов олигонуклеотидов с аминами через модифицированную фосфатную группу по реакции Штаудингера. Сокращения: DMT – 4,4'-диметокситригильная группа; B^o/B – защищенное/незащищенное азотистое основание.

По сравнению с опубликованным методом, основанным на введении на 5'-конец олигонуклеотида активированного N-гидроксисукцинимидного эфира [2], описанный способ позволяет избежать использования дорогостоящего и малоустойчивого амидофосфитного реагента.

В ходе данной работы был получен пентафторфениловый эфир 4-карбоксибензолсульфазида. С использованием этого активированного эфира были синтезированы производные олигонуклеотидов с активированной карбоксильной группой на 5'-концевом межнуклеотидном фосфате. Далее был получен ряд конъюгатов олигонуклеотидов с различными первичными аминами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 18-515-05007, 18-515-57006 и 18-29-08062) и Базового проекта ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (VI.62.1.3, 0309-2016-0005) «Терапевтические нуклеиновые кислоты». Синтез олигонуклеотидов выполнен при поддержке гранта РНФ № 17-44-07003.

Литература:

1. Купрюшкин М.С., Апухтина В.С., Васильева С.В., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Новый простой и удобный метод получения олигонуклеотидов, содержащих остатки пирена или холестерина. // Изв. Акад. Наук, Сер. Хим. – 2015. – № 7. – С. 1678-1681.
2. Lebedev A.V., Combs D., Hogrefe R.I. Preactivated carboxyl linker for the rapid conjugation of alkylamines to oligonucleotides on solid support. // Bioconjug. Chem. – 2007. – V. 18. – No. 5. – P. 1530-1536.

UDC: 577.113.(7+4)

A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATES WITH AMINES VIA THE PHOSPHATE GROUP

K.Klabenkova, E.Burakova, B.Chelobanov, A.Fokina A.A, D.Stetsenko

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8
e-mail: klabenkovakris@gmail.com*

A new method for the synthesis of oligonucleotide conjugates with different amines via a modified phosphate group has been designed. An activated ester of 4-carboxybenzenesulfonyl azide was introduced at the 5'-terminal internucleotidic position of the oligonucleotide via Staudinger reaction during solid-phase synthesis. After treatment with amines, oligonucleotide conjugates containing amide bond were obtained.

Key words: peptide conjugate; antisense (antisense) oligonucleotide; Staudinger reaction; activated ester; amide bond.

Oligonucleotide derivatives obtained by chemical modification are currently considered as promising therapeutic agents acting by antisense mechanism. The most often used are those modified at the phosphate group due to their relatively simple synthesis. However, the widespread introduction of therapeutic oligonucleotides into clinical practice is hampered by their low cellular uptake. One of the ways of solving this problem is the conjugation of the oligonucleotide with other molecules able to improve cellular uptake, for example, through the introduction of positively charged groups.

Previously we demonstrated that the Staudinger reaction between an organic azide and internucleotidic phosphite triester could be a convenient method for oligonucleotide modification [1]. In this work, we obtained crystalline 4-carboxybenzenesulfonyl azide pentafluorophenyl ester **1** (Fig. 1) – a reagent for the introduction of activated carboxyl group into the oligonucleotide via Staudinger reaction during solid-phase synthesis. Oligonucleotide derivatives with activated carboxyl group at the 5'-terminal internucleotidic phosphate were then synthesized using this activated ester. After treatment with an excess of the corresponding alkylamine, removal of protecting groups and cleavage from the polymer support, a series of oligonucleotide conjugates with various primary amines containing an amide bond were obtained in high yield (Fig. 1).

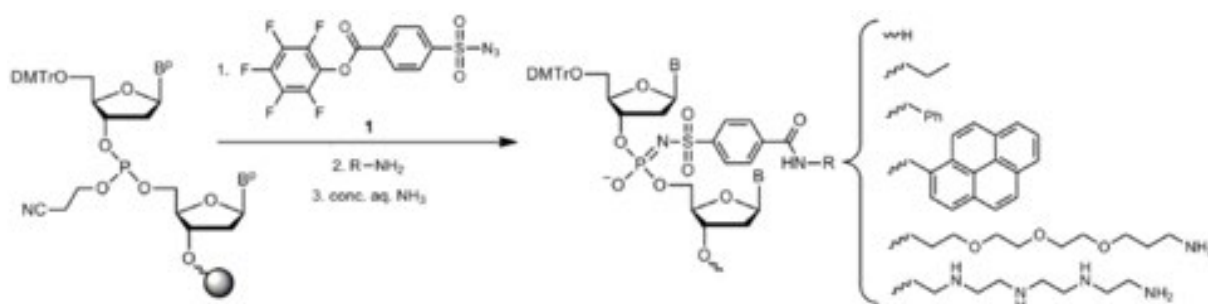


Fig. 1. Preparation of oligonucleotide conjugates with amines via a modified phosphate group by Staudinger reaction. Abbreviations: DMTr – 4,4'-dimethoxytrityl group; B^p/B – protected/unprotected nitrogenous base.

In comparison with the published method based on the introduction of activated N-hydroxysuccinimide ester onto the 5'-end of oligonucleotide [2], the described method avoids the use of an expensive and unstable phosphoramidite reagent.

In the course of this work, 4-carboxybenzene sulfazide pentafluorophenyl ether was obtained. Oligonucleotide derivatives with activated carboxyl group at the 5'-terminal internucleotidic phosphate were synthesized using this activated ester. Next, a series of conjugates of oligonucleotides with various primary amines was obtained.

This work was funded by Russian Foundation for Basic Research (grants Nos. 18-515-05007, 18-515-57006 and 18-29-08062) and partially by the Russian Government funded budget project VI.62.1.3, 0309-2016-0005 (2017–2020) "Therapeutic nucleic acids". Oligonucleotide synthesis was supported by Russian Science Foundation (grant No. 17-44-07003).

References:

1. Kupryushkin M.S., Apukhtina V.S., Vasilyeva S.V., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. A new simple and convenient method for preparation of oligonucleotides containing a pyrene or cholesterol moiety. // *Russ. Chem. Bull.* – 2015. – Vol. 64. – No. 7. – P. 1678-1681.
2. Lebedev A.V., Combs D., Hogrefe R.I. Preactivated carboxyl linker for the rapid conjugation of alkylamines to oligonucleotides on solid support. // *Bioconjug. Chem.* – 2007. – V. 18. – No. 5. – P. 1530-1536.

УДК: 579.61:577.112.083, ББК: 52.64

ПОИСК И БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ АЛКАЛОФИЛЬНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОМИКОЗОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

А.А. Баранова¹, И.А. Гаврюшина¹, Р.А. Габрия², А.Г. Дах²¹ФГБНУ НИИНА им. Г.Ф.Гаузе, Россия, 119021, Москва, Большая Пироговская, 11²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991, Москва, Трубецкая, 8e-mail: anjabaranowa@list.ru

Глобальной проблемой, с которой столкнулось человечество в XXI веке, является появление резистентности, а также множественной резистентности патогенных микроорганизмов к обычно используемым антибиотикам. Наряду с вызываемыми мультирезистентными бактериями заболеваниями, в мире наблюдается значительный рост заболеваемости микозами – инфекционными заболеваниями, обусловленными некоторыми видами плесневых, дрожжевых или диморфных грибов. По скорости развития резистентности грибы начинают выходить на первое место, часто вызывая смерть у иммунокомпрометированных больных. Распространение данных заболеваний объясняется, в первую очередь, отбором и накоплением в лечебных стационарах устойчивых к флуконазолу видов, а также развитием вторичной устойчивости у чувствительных видов. Таким образом, современное состояние медицинской практики в области микозов требует новых препаратов, активных в отношении резистентных патогенных штаммов грибов. Среди природных соединений с антибиотической активностью, наибольший интерес вызывают соединения, имеющие пептидный каркас. Природные антимикробные пептиды грибов являются одним из важнейших источников новых эффективных антибиотиков за счет широкого спектра действия в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий и грибов, низкой токсичности и отсутствия формирования резистентности. При этом они обладают способностью ингибировать развитие микроорганизмов, в большинстве случаев посредством механизмов, отличных от молекулярных мишеней большинства традиционных антибиотиков. В период 2011–2018 гг проведен масштабный скрининг коллекции экстремофильных микромицетов (коллекции ФГБНУ НИИНА, МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского). Из недавно описанного алкалофильного вида *Emericellopsis alkalina* [1] выделен и охарактеризован новый антимикробный пептид – эмерицеллипсин А с выраженными противогрибковыми свойствами, активный в отношении клинических грибов с множественной резистентностью [2]. Кроме того, эмерицеллипсин А показал значительный цитотоксический эффект в отношении линий опухолевых клеток Hep G2 и HeLa.

Ключевые слова: Пептаболы, алкалофилы, эмерицеллипсин А, *Emericellopsis alkalina*, антимикотики, цитотоксическая активность

Объектом исследования был штамм A118 *Emericellopsis alkalina* F 1428 (номер GenBank: KC999014.1), отобранный в ходе скрининга 22 алкалофильных изолятов недавно описанного вида *Emericellopsis alkalina* Bilanenko & Georgieva, выделенных из щелочных засоленных почв различных географических регионов. Культуры получены из коллекции “Грибы экстремальных местообитаний” кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им.М.В. Ломоносова.

Оценка антимикробной активности 22 штаммов *E. alkalina* в отношении тест-грибов и бактерий показала, что культуры с антимикотическим действием в отношении *A. niger* INA 00760 составляли 27 % от всех исследованных штаммов, в то время как антибактериальным действием в отношении *B. subtilis* ATCC 6633 только 5 % от общего числа штаммов. Такая специфичность антимикробного действия может

быть обусловлена конкуренцией грибов в сходных условиях обитания, при которой одним из механизмов является продукция антибиотических веществ.

Максимальный синтез антибиотика был установлен на оптимизированной щелочной среде (pH=10.5) состоящей из (г/л): Na₂CO₃ - 24 г, NaHCO₃ - 6 г, NaCl - 6 г, KNO₃ - 1 г, K₂HPO₄ - 1 г; солодовый экстракт - 200 мл, дрожжевой экстракт - 1 г, что может быть связано с алкалофильным типом адаптации.

Разделение экстракта культуральной жидкости (КЖ) осуществляли с помощью флэш-хроматографии. Дальнейшее разделение активных фракций после флэш-хроматографии проводили методом аналитической обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), с использованием колонки XBridge 5 мкм 100A размером 250 × 4.6 мм ("Waters", США). В качестве подвижной фазы элюент А – 0.1%-ная трифторуксусная кислота, ТФУ, в воде MQ; элюент В – 80%-ный ацетонитрил с 0.1%-ным водным раствором ТФУ при скорости потока 950 мкл/мин. С целью масштабирования получения индивидуальных компонентов спиртового концентрата экстракта КЖ продуцента было проведено его аналогичное разделение методом полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ на колонке XBridge 10 мкм 100A (250 × 10 мм). Поглощение определяли при длине волны 214 нм и скорости потока подвижной фазы 4 мл/мин. Полученные в ходе полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ фракции, соответствующие отдельным пикам, были собраны вручную.

Тестирование полученных фракций на наличие антимикробных свойств позволило выявить активность в одной наиболее гидрофобной фракции, соответствующей отдельному пику. Образец антибиотика (Эмерицеллипсина А) анализировали с помощью системы LC-MS / MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)[3]. Спектры ЯМР были записаны на спектрометре AvanceBruker 800 (BrukerBiospin, Rheinstetten, Germany). Чтобы определить структуру эмерицеллипсина А, использовался традиционный подход, основанный на ЯМР, включающий анализ 2D COZY, 2D 1H-13C HSQC, 2D 1H-15N HSQC, 2D 1H-13C NMBC, 2D 1H-15N NMBC и 2D 1H-13C HSQC-TOCSY спектров. 2D ROESY (время смешивания 200 мс) был записан для определения конфигурации стерео центров.

В соответствии с ЯМР-спектрами эмерицеллипсин А представляет собой линейный полипептид, с 2-метилдекановой кислотой (2MDA) на N-конце и N- (2-гидроксиэтил) -1,2-пропандиамина на C-конце. Пептид образует альфа-спираль и содержит 8 карбоксильных и кетонных групп. Из 7 аминокислотных остатков два представлены аланином и изолейцином, а остальные - 3-метилпролином (ЗМП), 2-амино-4-метил-6-гидрокси-8-оксодекановой кислотой (АНМОД)[4], 2-аминоизобутиратом (АИБ), изовалином и β-аланином. ЯМР-спектры показали молекулярную формулу C₅₄H₉₉N₉O₁₁ с изотопной молекулярной массой 1049,746, что согласуется с масс-спектрами (1049,7568).

Эмерицеллипсин А является типичным представителем так называемых липоаминопептидов[5]. Эти пептиды характеризуются присутствием альфа-метилразветвленной жирной кислоты на N-конце, с последующим производным пролина в положении 2 и АНМОД в положении 3.

Изучена динамика роста и проведен стабилизирующий отбор штамма-продуцента *E. alkalina* ВКПМ F-1428 в различных биотехнологических системах. Подобраны условия управляемого биосинтеза по признаку антибиотикообразования эмерицеллипсина А и разработан лабораторный регламент его получения.

Совместно с сотрудниками ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» (МНПЦБТ) были проведены серии испытаний спектров антифунгальной активности на клинически значимых изолятах часто обнаруживаемых видов у больных оппортунистическими микозами и туберкулезом. Получены новые данные об активности пептида в отношении клинических штаммов 12 патогенных видов грибов с множественной резистентностью к азолам и эхинокандинам. Установлен уровень природной чувствительности основных и редких возбудителей аспергиллеза и кандидоза, а также возбудителей дрожжевых микозов. Эмерицеллипсин А ингибирует рост изолятов клинических микромицетов, но особенно эффективен против *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *S. cerevisiae* и *C. laurentii*. Ранее для этих клинических изолятов была установлена и подтверждена экспериментально вариативная или сниженная чувствительность к отдельным широко применяющимся в лечении туберкулезных больных препаратам. Возможным перспективным применением антимикробных пептидов (пептаиолов) может быть использование их в качестве альтернативных новых природных антибиотиков для лечения инвазивных и поверхностных форм микозов, резистентных к стандартной лекарственной терапии.

Изучена способность 22 штаммов алкалофильных микромицетов рода *Emericella* к синтезу антимикробных пептаиолов, обладающих антифунгальной активностью. Установлено, что продукция пептаиолов является штаммоспецифичным признаком и зависит от условий культивирования, концентрации сахаров и солености среды. Исследования показали, что новый пептаиол эмерицеллипсин А, выделенный из *E. alkalina* F 1428 в опытах *in vitro* обладает рядом преимуществ перед лекарственными противогрибковыми средствами, используемыми в клинике. Эмерицеллипсин А ингибирует рост изолятов клинических микромицетов, основных возбудителей инвазивных микозов, особенно эффективен против

A. terreus, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *S. cerevisiae* и *C. laurentii* – основных возбудителей хронических аспергиллезов легких и аспергиллемы легких. Ранее для этих клинических изолятов была установлена и подтверждена экспериментально сниженная чувствительность к отдельным препаратам широко применяющимся в лечении туберкулезных больных.

Разделы работы, посвященные ВЭЖХ анализу концентратов штаммов *E. alkalina* и определению антифунгальной активности, выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10073) Работа по формированию и хранению коллекции алкалофильных грибов проведена в рамках Государственного задания, части 2 п. 01 10 (тема № AAAA-A16-116021660088-9) и гранта РФФИ № 17-53-53130.

Литература:

1. Grum-Grzhimaylo, A.A., Georgieva, M.L., Debets, A.J.M., Bilanenko, E.N., 2013. Are alkalitolerant fungi of the *Emericellopsis* lineage (Bionectriaceae) of marine origin? *IMA Fungus* 4, 213–228. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2013.04.02.07>
2. Баранова, А.А., Георгиева, М.Л., Биланенко, Е.Н., Андреев, Я.А., Рогожин, Е.А., Садыкова, В.С., 2017. Антимикробный потенциал алкалофильных микромицетов, *Прикладная биохимия и микробиология* 616–624. <https://doi.org/10.7868/S0555109917060034>
3. Rogozhin, E., Sadykova, V., Baranova, A., Vasilchenko, Alexey, Lushpa, V., Mineev, K., Georgieva, M., Kul'ko, A., Krashennnikov, M., Lyundup, A., Vasilchenko, Anastasia, Andreev, Y., 2018. A Novel Lipopeptaibol *Emericellipsin A* with Antimicrobial and Antitumor Activity Produced by the Extremophilic Fungus *Emericellopsis alkalina*. *Molecules* 23, 2785. <https://doi.org/10.3390/molecules23112785>
4. Auvin-Guette, C.; Rebuffat, S.; Prigent, Y.; Bodo, B. *Trichogin A IV*, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 2170–2174.
5. Degenkolb, T.; Berg, A.; Gams, W.; Schlegel, B.; Gräfe, U. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J. Pept. Sci.* 2003, 9, 666–678.

UDC: 579.61:577.112.083

SEARCH AND BIOTECHNOLOGY OF PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM ALKALOPHILIC MICROMYCETES ACTIVE AGAINST PATHOGENS OF PNEUMOMYCOSIS WITH MULTIPLE RESISTANCE

A. Baranova¹, I. Gavryushina¹, R. Gabriya², A. Dakh²

¹Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Russia, 119021, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya, 11

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Russia, 119991, Moscow, Trubetskaya, 8
e-mail: anjabaranowa@list.ru

The global challenge for humanity in the twenty-first century is the emergence of resistance, as well as multiple resistance of pathogens to commonly used antibiotics. Along with the diseases caused by multi – resistant bacteria, there is a significant increase in the incidence of mycoses-infectious diseases caused by some types of mold, yeast or dimorphic fungi. The development of resistance becomes the most rapid in fungi and often cause death of immunocompromised patients. The spread of these diseases is primarily due to the selection and accumulation of species resistant to fluconazole in medical hospitals, as well as the development of secondary resistance in sensitive species. Thus, the current state of medical practice in the field of mycoses requires new drugs that are active against resistant pathogenic strains of fungi. Among the natural compounds with antibiotic activity, the most interesting are the compounds having a peptide framework. Natural antimicrobial peptides of fungi are one of the most important sources of new effective antibiotics due to a wide spectrum of activity against opportunistic and pathogenic bacteria and fungi, low toxicity and lack of resistance development. At the same time, they have the ability to inhibit the growth of microorganisms, in most cases through mechanisms different from those of most traditional antibiotics. In the period 2011-2018, a large-scale screening collection of extremophilic micromycetes (collection of Gause Institute of New Antibiotics, MSU M. V. Lomonosov, Institute of Microbiology S. N. Vinogradsky) was carried out. A new antimicrobial peptide – emericillipsin A with pronounced antifungal properties, active against clinical fungi with multiple resistance[2], was isolated from the recently described alkalophilic species *Emericellopsis alkaline*[1] and characterized. Additionally, emericillipsin A showed a significant cytotoxic effect and was highly active against Hep G2 and HeLa tumor cell lines.

Key words: Peptaibol, alkalophils, emericellipsin A, Emericellopsis alkalina, antifungal activity, antibacterial activity, cytotoxic properties

The object of the study was the strain A118 Emericellopsis alkalina F1428 (GenBank number, KC999014.1) selected in screening of 22 alkalophilic strains of the newly described fungus Emericellopsis alkaline Bilanenko&Georgieva isolated from alkaline saline soils of different geographic regions. The cultures were obtained from the collection "Fungi of Extreme Conditions" of the Department of Mycology and Algology of the Biology Department (Lomonosov Moscow State University).

Evaluation of the antimicrobial activity of 22 strains E. alkalina against test fungi and bacteria showed that cultures with antimicrobial action against A. niger INA 00760 accounted for 27% of all tested strains, whereas only 5% of all strains exhibited an antibacterial effect towards B. subtilis ATCC 6633. This specificity of the antimicrobial action may be caused by the competition between fungi in similar habitats, and one of the mechanisms of this competition is the production of antibiotic substances.

The maximum antibiotic synthesis was set on special alkaline medium (pH 10.5) that consisted of (per liter of tap water): salts: Na₂CO₃–24 g, NaHCO₃–6 g, NaCl–6 g, KNO₃–1 g, K₂HPO₄–1 g; malt extract–200 mL, yeast extract–1 g, which may be associated with the alkaliphilic type of adaptation.

The separation of the extract of the culture liquid (CL) was carried out using flash chromatography. The subsequent separation of the active fractions after flash chromatography was carried out by analytical reverse-phase high performance liquid chromatography (RP HPLC) with an XBridge column (5 µm 100A, 250 × 4.6 mm, Waters, United States). As a mobile phase, eluent A - 0.1% trifluoroacetic acid, TFA, in MQ water; eluent B - 80% acetonitrile and 0.1% aqueous solution of TFA at a flow rate of 950 µL/min. Scaling for obtaining individual components of ethanol concentrate derived from the extract of the producer CL was performed by semipreparative RP HPLC on an XBridge column (10 µm 100A, 250 × 10 mm, Waters, United States). The compounds were detected at 214 nm at a flow rate of 4 mL/min. The fractions obtained during the semi-preparatory RP-HPLC, corresponding to the individual peaks, were collected manually.

Testing the obtained fractions for the presence of antimicrobial properties allowed us to detect activity in one of the most hydrophobic fraction corresponding to a single peak. The peptide sample (Emericellipsin A) was analyzed with an LC-MS/MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)[3]. All NMR spectra were recorded on the Avance Bruker 800 spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). To determine the structure of emericellipsin A, we employed the conventional NMR-based approach, involving the analysis of 2D COSY, 2D 1H-13C HSQC, 2D 1H-15N HSQC, 2D 1H-13C HMBC, 2D 1H-15N HMBC, and 2D 1H-13C HSQC-TOCSY spectra. 2D ROESY (200 ms mixing time) was recorded to determine the configuration of stereo centers.

According to NMR spectra, emericellipsin A is a linear polypeptide flanked by the 2-methyldecanoic acid (2MDA) at the N-terminus and by N-(2-Hydroxyethyl)-1,2-propanediamine at the C-terminus. Peptide contains eight carboxyl and one ketone groups, the presence of eight amino groups and one ternary nitrogen was confirmed based on the 1H-15N HSQC and 1H-15N HMBC spectra. Out of seven amino acid residues, two were conventional (alanine and isoleucine), and other were 3-methylproline (3MP), 2-Amino-4-methyl-6-hydroxy-8-oxo decanoic acid (AHMOD) [4], 2-aminoisobutyrate (AIB), isovaline, and β-alanine. NMR spectra revealed the molecular formula C₅₄H₉₉N₉O₁₁ with the isotopic molecular mass 1049.746 that agreed with the mass spectra (1049.7568).

Emericellipsin A is a typical representative of so-called lipopeptides or aminolipopeptides subfamily of peptaibols[5]. These peptides are characterized by the presence of alpha-methyl branched fatty acid at the N-terminus, followed by the proline derivative at position 2 and AHMOD at position 3.

The growth dynamics was studied and a stabilizing selection of the producer strain E. alkaline VKPM F-1428 was carried out in various biotechnological systems. The conditions of controlled biosynthesis on the basis of antibiotic formation of emericellipsin A were selected and the laboratory regulations for its production were developed.

A series of trials of antifungal activity spectra on clinically significant isolates of frequently found species in patients with opportunistic mycosis and tuberculosis were conducted together with the staff of the State Budgetary Health Institution "MNPTs for the Control of DZM Tuberculosis" (MNPTST). New data on peptide activity against clinical strains of 12 pathogenic fungi species with multiple resistance to azoles and echinocandins were obtained. The level of natural sensitivity of the main and rare pathogens of aspergillosis and candidiasis, as well as pathogens of yeast mycoses, was established. Emericellipsin A inhibits the growth of clinical micromycete isolates, but is particularly effective against A. terreus, A. fumigatus, A. ochraceus, S. cerevisiae and C. laurentii. Previously, for these clinical isolates, varying or reduced sensitivity to some widely used in the treatment of tuberculosis drugs was established and confirmed experimentally. A possible use of antimicrobial peptides (peptaibols) as alternative new natural antibiotics for the treatment of invasive and superficial forms of mycoses resistant to standard drug therapy is promising.

The ability of 22 strains of alkaliphilic micromycetes of the genus *Emericellopsis* to the synthesis of antimicrobial peptaibols having antifungal activity was studied. It was found that the production of peptaibols is a strain-specific feature and depends on the conditions of cultivation, sugar concentration and salinity of the medium. Studies have shown that new peptaibol emericellipsin A, isolated from *E. alkalina* F 1428 in in vitro experiments, has several advantages over antifungal agents used in the clinical practice. Emericellipsin A inhibits the growth of isolates of clinical micromycetes, the main causative agents of invasive mycoses, and is especially effective against *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *S. cerevisiae* and *C. laurentii* - the main causative agents of chronic pulmonary aspergillosis and lung aspergilloma. Previously, for these clinical isolates, the experimentally reduced sensitivity to some drugs widely used in the treatment of tuberculosis was established and confirmed experimentally.

Sections of the work on HPLC analysis of *E. alkalina* strain concentrates and the determination of antifungal activity were carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (Grant No. 18-74-10073). The work on the formation and storage of the collection of alkaliphilic fungi was carried out as part of the State task, part 2, 01 10 (theme No. AAAA-A16-116021660088-9) and RFBR grant No. 17-53-53130.

References:

1. Grum-Grzhimaylo, A.A., Georgieva, M.L., Debets, A.J.M., Bilanenko, E.N., 2013. Are alkalitolerant fungi of the *Emericellopsis* lineage (Bionectriaceae) of marine origin? *IMA Fungus* 4, 213–228. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2013.04.02.07>
2. Baranova, A.A., Georgieva, M.L., Bilanenko, E.N., Andreev, Y.A., Rogozhin, E.A., Sadykova, V.S., 2017. Antimicrobial potential of alkaliphilic micromycetes *Emericellopsis alkalina*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 53, 703–710. <https://doi.org/10.1134/S0003683817060035>
3. Rogozhin, E., Sadykova, V., Baranova, A., Vasilchenko, Alexey, Lushpa, V., Mineev, K., Georgieva, M., Kul'ko, A., Krashennnikov, M., Lyundup, A., Vasilchenko, Anastasia, Andreev, Y., 2018. A Novel Lipopeptaibol Emericellipsin A with Antimicrobial and Antitumor Activity Produced by the Extremophilic Fungus *Emericellopsis alkalina*. *Molecules* 23, 2785. <https://doi.org/10.3390/molecules23112785>
4. Auvin-Guette, C.; Rebuffat, S.; Prigent, Y.; Bodo, B. Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 2170–2174.
5. Degenkolb, T.; Berg, A.; Gams, W.; Schlegel, B.; Gräfe, U. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J. Pept. Sci.* 2003, 9, 666–678.

УДК: 615.373.03:616.41-006.04

РАЗРАБОТКА БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ CD3/CD19 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ В-КЛЕТОЧНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

П. Славный¹, С.Г. Аббасова², А.М. Азарова², Джон Маккаферти¹, Д.А. Потеряев² и А.А. Пискунов²

¹ IONTAS Ltd Unit 2, Iconix Park, Лондон Роуд, Памписфорд, Кембриджшир, CB22 3EG, Великобритания

² ООО «МБЦ»Генериум», ул. Владимирская 14, Вольгинский, Российская Федерация
e-mail: piskunov@ibcgenerium.ru

Получены биспецифические антитела CD3/CD19 обладающие противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: биспецифические антитела, В-клетки, Т-клетки, лейкоз

В настоящее время комбинированная химиотерапия является стандартом для лечения большинства В-клеточных злокачественных новообразований. Тем не менее, существует необходимость в новых методах лечения, поскольку (i) интенсивная химиотерапия неприменима у пациентов с определенными сопутствующими заболеваниями из-за ее токсичности, и (ii) у значительной части пациентов развиваются рецидивы с резистентностью к химиотерапии. Для лечения таких состояний в течение последнего десятилетия было разработано несколько новых биологических препаратов, названных биспецифическими антителами. Эти антителообразные молекулы с двойной специфичностью к CD19 (общий антиген В-линии) и CD3 (корцептор Т-клеток) связывают Т-лимфоциты для элиминации CD19+ В-клеток. С помощью технологии фагового дисплея, мы селектировали новые антитела, связывающие комплекс CD3 человека. Используя нашу запатентованную платформу BIMS, мы разработали несколько конструкций биспецифических антител с паратопами, связывающими человеческие антигены CD3 и CD19. В доклинических исследованиях на грызунах антитела BIMS при однократном введении период полувыведения составил 5,8 дня. BIMS кан-

дидаты продемонстрировали Т-клеточно-зависимую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток *in vitro* и нормальных В-клеток в анализе цельной крови *ex vivo* с $EC_{50} = 0,07$ пМ. Нами продемонстрировано что BIMS - опосредованное уничтожение CD19+ клеток, сопровождается зависимой от мишени активацией и пролиферацией Т-клеток с повышением регуляции гранзима В и перфорина. Высвобождение цитокинов, которое также связано с активацией Т-клеток, происходит начиная с концентрации 1 пМ и полностью блокируется премедикацией дексаметазоном, что указывает на многообещающий профиль безопасности антител против BIMS CD3 / CD19. Наконец, кандидаты BIMS демонстрируют противоопухолевую активность на модели острого лимфобластного лейкоза *in vivo*, превосходящую стандартную комбинированную химиотерапию.

UDC: 615.373.03:616.41-006.04

DEVELOPMENT OF CD3/CD19 BISPECIFIC ANTIBODIES FOR TREATMENT OF B-CELL MALIGNANCIES

P. Slavny¹, S.Abbasova², A.Azarova², J.McCafferty¹, D.Poteryaev², A.Piskunov²

¹ IONTAS Ltd Unit 2, Iconix Park, London Road, Pampisford, Cambridgeshire, CB22 3EG, UK

² IBC Generium LLC, Vladimirskaia str. 14, Volginskiy, Russian Federation

e-mail: piskunov@ibcgenerium.ru

We obtained bispecific antibodies CD3 / CD19 with antitumor activity *in vitro* and *in vivo*.

Key words: bispecific antibodies, B cells, T cells, leukemia

Currently, combination chemotherapy is a standard for treatment of most B-cell malignancies. However, there is need of new therapies since (i) intensive chemotherapy is not applicable in patients with certain comorbidities due to its toxicity and (ii) significant portion of patients develops relapses with resistance to chemotherapy. To treat such conditions, several new biologics termed bi-specific antibodies have been developed during last decade. These antibody-like molecules with dual specificity to CD19 (common B-lineage antigen) and CD3 (a T-cell co-receptor) engage T lymphocytes to eliminate CD19-expressing B cells. Using phage display technology, we isolated novel antibodies binding human CD3 complex. Employing our proprietary platform BIMS, we developed several bispecific antibody constructs with paratopes binding human CD3 and CD19 antigens. In pre-clinical studies in rodents, BIMS CD3/ CD19 antibodies displayed a terminal half-life of 5.8 days. Our candidates demonstrated T-cell dependent cytotoxicity against tumor cells *in vitro* and normal B-cells in *ex vivo* whole blood assay with $EC_{50} = 0.07$ пМ. BIMS - mediated killing of CD19+ cells accompanied by target-dependent T-cell activation and proliferation with up regulation of granzyme B and perforin. Cytokine release, which was also associated with T-cell activation, was observed starting from only 1 пМ concentration and was completely blocked by dexamethasone premedication, indicating promising safety profile of BIMS CD3/CD19 antibodies. Finally, BIMS candidates demonstrate *in vivo* antitumor activity superior than standard chemotherapy combination.

УДК 543.51.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ АНАЛИЗА ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ПОМОЩИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Индейкина М.И.¹, Годованный А.В.², Бугрова А.Е.¹, Казиева Л.Ш.³, Жученко М.⁴, Бржозовский А.Г.⁵, Кононихин А.С.¹, Николаев Е.Н.^{1,5}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,

e-mail: alex.kononikhin@gmail.com

²ГосНИИгенетика, НИЦ «Курчатовский институт»

³Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

⁴ООО «ФАРМАПАРК»

⁵Сколковский институт науки и технологий

e-mail: e.nikolaev@skoltech.ru

Разработан подход для анализа первичной структуры моноклональных антител, на примере терапевтического антитела экулизумаб, позволяющий охарактеризовать аминокислотную последовательность легкой и тяжелой цепей, определить пост-трансляционные модификации (ПТМ), локализацию и статус сульфгидрильных остатков цистеина, а также определить наличие протеоформ и усеченных форм антитела.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, моноклональные антитела, первичная последовательность, пост-трансляционные модификации (ПТМ), протеоформы

Цель исследования: разработать подход для анализа первичной структуры моноклональных антител, на примере терапевтического антитела экулизумаб, с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения.

Объектом исследования являлись три образца экулизумаба - Солирис® (Soliris®), концентрат для приготовления раствора для инфузий 10 мг/мл, Alexion Pharma International Sarl (Швейцария). Перед масс-спектрометрическим анализом все образцы проходили очистку с помощью твердофазной экстракции и были дегликозилированы (анализ гликанов проводился в рамках отдельного исследования). Анализ первичной последовательности образцов экулизумаба проводился после обработки образцов тремя различными ферментами: трипсином, Lys-C и Glu-C, и их комбинация. Полученные пептиды анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием нанопоточного хроматографа Agilent 1100 (Agilent, США) в тандеме с масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ FT Ultra (Thermo, Германия) на базе ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН. Для идентификации пептидов были использованы комбинированные биоинформационные подходы для анализа масс-спектрометрических данных, включающие подход идентификации с использованием аминокислотной последовательности белка и подход де novo секвенирования при помощи программы Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., США). Для идентификации пептидов использовалась аминокислотная последовательность белка согласно базе данных UniprotKB. Для анализа S-S связей масс-спектры пептидов, полученных в результате гидролиза различными ферментами, анализировались в программе StavroX (Германия). Для анализа полноразмерных форм белка использовались времяпролетный масс-спектрометр, оснащенный ячейкой ионной подвижности TIMS-TOF (Bruker, Германия), а также времяпролетный масс-спектрометр с ионизацией методом MALDI и столкновительной фрагментационной ячейкой Ultraflex (Bruker, Германия).

Разработан подход с использованием комплементарных методов масс-спектрометрии и биоинформационных методов анализа данных для исследования первичной структуры моноклональных антител. Проведен анализ первичной структуры образцов экулизумаба (Солирис®). В результате использования различных ферментов (трипсин, Lys-C и Glu-C, и их комбинаций) получено 100% покрытие сиквенса. Показано, что первичная структура образцов экулизумаба (Солирис®) не имеет существенных отличий, гетерогенности по концам не наблюдается. При анализе модификаций отмечено, что 1 остаток тяжелой цепи конвертирован в пироглутамат. Высокая степень дезамидирования наблюдается по остатку 298, 316 и 385 тяжелой цепи. В легкой цепи значимых уровней дезамидирования не наблюдается. Подтверждены ожидаемые в образцах внутренние S-S связи (HH, LL), вариации в количествах незначительные: HH 22-96, 149-205, 262-322, 368-426; LL 23-88, 134-194. Не подтверждены ожидаемые в образцах S-S связи между L и H: HL 136-214, при этом наблюдается другая HL связь - H262_L214. Методом масс-спектрометрии высокого разрешения была подтверждена точная молекулярная масса (147878.4 Да) основной протеоформы антитела. Обнаружено 5 основных протеоформ, обусловленных главным образом гликозилированием. Усеченных форм антитела не наблюдалось.

Разработан подход с использованием комплементарных методов масс-спектрометрии и биоинформационных методов анализа данных для исследования первичной структуры моноклональных антител. Используя подход удалось полностью определить первичную последовательность терапевтического антитела экулизумаб, включая пост-трансляционные модификации (ПТМ), локализацию и статус сульфгидрильных остатков цистеина, а также наличие протеоформ и усеченных форм антитела.

UDC 543.51.

DEVELOPMENT OF AN APPROACH TO PRIMARY SCTRUCTURE ANALYSIS OF MONOCLONAL ANTIBODIES BY HIGH-RESOLUTION MASS-SPECTROMETRY

Indeikina M.I.¹, Godovanny A.V.², Bugrova A.E.¹, Kazieva L.Sh.³, Zhuchenko M.⁴, Brzhozovsky A.G.⁵, Kononikhin A.S.¹, Nikolaev E.N.^{1,5}

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia,

e-mail: alex.kononikhin@gmail.com

²Federal Institution "State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center" Kurchatov Institute", Moscow, Russia

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴PHARMAPARK LLC, Moscow, Russia

⁵Skolkovo Institute of Science and Technology

e-mail: e.nikolaev@skoltech.ru

An approach for primary structure analysis of monoclonal antibodies was developed and applied for therapeutic antibody eculizumab to characterize amino acid sequence of light and heavy chains, to identify post-translational modifications (PTMs), to determine localization and state of sulfhydryl groups of cysteine, and to detect possible proteoforms and truncated forms.

Key words: mass-spectrometry, monoclonal antibody, primary sequence, eculizumab, post-translational modifications (PTMs), proteoforms

Aim to develop an approach for primary structure analysis of monoclonal antibodies by high-resolution mass-spectrometry and to characterize therapeutic antibody eculizumab.

Materials and methods: The study objects were the three samples of eculizumab (Soliris®) concentrate for solution for infusion 10 mg/ml, Alexion Pharma International Sarl (Switzerland). Prior to mass-spectrometry all samples were purified by solid-phase extraction and were deglycosylated (glycans were not analysed in the frame of this study). Analysis of primary sequence of eculizumab was performed after hydrolysis of samples with different enzymes: trypsin, Lys-C, Glu-C and their combinations. Mixture of derived peptides was analysed by HPLC-MS/MS using Agilent 1100 chromatograph (Agilent, USA) in tandem with high-resolution mass-spectrometer 7T LTQ FT Ultra (Thermo, Germany) in the Core facility of Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS. For peptide identification combined bioinformatic approaches were used to process the mass-spectrometric data, including sequencing based on theoretical sequence of protein and de novo sequencing via Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., USA). The theoretical protein sequence was taken from UniprotKB database. To identify the localization of disulfide bonds (S-S bonds) the mass-specters of peptides, derived from hydrolysis by different enzymes, were interpreted using StavroX (Germany) software. Native protein was analysed by time-of-flight mass-spectrometer with ion mobility cell TIMS-TOF (Bruker, Germany), and time-of-flight mass-spectrometer with MALDI-ionization and collision-induces dissociation Ultraflex (Bruker, Germany).

We have developed an approach using complementary methods of mass-spectrometry and bioinformatic methods of data procession for study of primary structure of monoclonal antibodies. Primary structure of eculizumab (Soliris®) was determined. By usage of several enzymes (trypsin, Lys-C, Glu-C and their combinations) 100% coverage of protein sequence was obtained. The primary structure of samples of eculizumab (Soliris®) has shown no significant difference, heterogeneity of ends was not found. During the identification of PTMs conversion in pyroglutamate of 1 amino acid residue in heavy chain was identified. High level of deamidation in 298, 316 and 385 residues in heavy chain was found. Deamidation in light chain was not found. Expected internal (HH, LL) S-S bonds were confirmed with low quantitative variation: HH 22-96, 149-205, 262-322, 368-426; LL 23-88, 134-194. Expected S-S bonds between heavy and light chains HL 136-214 was not confirmed, however a different S-S bond H262-L214 was found. By high-resolution mass-spectrometry the accurate molecular weight of eculizumab was determined (147878.4 Da) of antibody main proteoform. It was shown that 5 main proteoforms of antibody are present, mainly due to glycosylation. Truncated forms were not found.

An approach based on complementary mass-spectrometry and bioinformatic methods for study of primary structure of monoclonal antibodies was developed. Application of approach for therapeutic antibody eculizumab was performed allowing to characterize full primary sequence of antibody, to identify post-translational modifications (PTMs), to determine localization and state of sulfhydryl groups of cysteine, and to detect possible proteoforms and truncated forms.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Исеркапов А.В., Фабричный И.П.

ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», Владимирская обл., п. Вольгинский, Россия
601125, Владимирская обл., п. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14
e-mail: iserkapov@ibcgenerium.ru

В данной работе представлены экспериментальные результаты использования современных подходов к очистке рекомбинантных белков. Показана эффективность применения мультимодальных сорбентов и мембранной хроматографии в очистке белков терапевтического назначения.

Ключевые слова: рекомбинантные белки, мультимодальная хроматография, мембранная хроматография

Современные биофармацевтические лекарственные средства позволяют ежегодно оказывать помощь миллионам людей. При этом, к качеству и безопасности таких препаратов предъявляются жесткие требования, что в свою очередь делает необходимым достижение высокой степени их чистоты в процессе производства. С другой стороны, усложнение и увеличение числа этапов очистки рекомбинантных белков, обычно являющихся основным действующим веществом, приводит к снижению выхода и повышению их себестоимости.

В настоящее время основным способом выделения и очистки белков из культуральной жидкости является жидкостная хроматография. На биофармацевтических производствах широко используются как традиционные (аффинная, ионообменная, гидрофобная) так и более современные (мультимодальная, мембранная) виды хроматографии.

Применение мультимодальных сорбентов (хроматография смешанного типа) позволяет добиться высокого качества продукта и снизить его потери в процессе очистки. Кроме этого, как правило, мультимодальная хроматография выполняется при больших нагрузках белка на сорбент и требует меньших объемов носителя и буферных растворов, чем традиционные виды хроматографии.

Уникальная селективность сорбентов смешанного типа является следствием особой структуры их лигандов, способных связывать биомолекулы путем реализации сразу нескольких видов взаимодействий (электростатического, гидрофобного, водородной связи или других). Поскольку количество мультимодальных сорбентов с уникальными свойствами неуклонно растет, то, вероятно, в будущем это приведет ко все большему использованию данного типа хроматографии в научных и производственных целях.

UDC 543.544.5

MODERN TECHNOLOGIES OF RECOMBINANT PROTEINS PURIFICATION

Iserkapov A.V., Fabrichny I.P.

Limited Liability Company «International biotechnology center «Generium», Vladimir Region, Volginsky village, Russia
601125, Vladimir Region, Volginsky village, Vladimirskaia 14
e-mail: iserkapov@ibcgenerium.ru

In this work, we present experimental results of the application of modern approaches for recombinant proteins purification. The efficiency of multimodal resins and membrane chromatography in therapeutic proteins purification is demonstrated.

Key words: recombinant proteins, mixed-mode chromatography, membrane chromatography

Modern biopharmaceuticals provide medical treatment for millions of people every year. Therefore, strict quality and safety requirements have been applied to such products, that, in turn, leads to high product purity becoming the key characteristic to be achieved during its production. On the other hand, complicating or increasing the number of purification steps upon recombinant proteins (which usually represent the main active ingredient) production results in lower yields and higher product prime cost.

Currently, protein purification from cell culture medium is mainly performed by means of liquid chromatography. For industrial biopharmaceutical production, both traditional (affinity, ion-exchange, hydrophobic interaction) and novel (mixed-mode, membrane) chromatography techniques are used.

Application of multimodal resins (mixed-mode chromatography, MMC) allows attaining the high product quality and decrease in protein loss during the purification process. In addition, mixed-mode chromatography is usually performed at higher values of protein load per resin volume and, consequently, requires fewer amounts of both resin and corresponding buffer solutions than traditional chromatography approaches.

The outstanding selectivity of multimodal resins is due to the distinctive structure of their ligands, which can bind biomolecules through simultaneous implementation of several types of interaction (electrostatic, hydrophobic, hydrogen-bonding etc.). Since the number of different mixed-mode resins having unique features is steadily growing, it will likely result in wider implication of this chromatography technique for future laboratory and production purposes.

УДК 57.088.1

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ИМИГЛЮЦЕРАЗЫ БИОАНАЛОГИЧНОГО И РЕФЕРЕНТНОГО ПРЕПАРАТА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Дегтерев М.Б., Смолов М.А., Вишневский А.Ю., Шукуров Р.Р.

ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», Вольгинский, Россия
601125, Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д.14
e-mail: degterev@ibcgenerium.ru

Ключевые слова: имиглюцераза, биоаналог, масс-спектрометрия, гликозилирование

При помощи методов ВЭЖХ и масс-спектрометрии было проведено исчерпывающее сравнительное исследование молекул референтного («Церезим®», («Джензайм», Европа, Б.В. Нидерланды)) и биоаналогичного («Глуразим», АО «Генериум», Россия) препарата имиглюцеразы, по результатам которого было подтверждено их биоподобие.

Болезнь Гоше – это орфанное генетическое заболевание, вызываемое недостатком активности фермента глюкоцереброзидазы, приводящему к накоплению в клетках сфинголипида глюкоцереброзида. Симптомы заболевания включают в себя спленомегалию, тромбоцитопению, анемию, кровоизлияния, хроническую усталость и разнообразные неврологические проявления [1]. На сегодняшний день основным способом лечения болезни является ферментозаместительная терапия рекомбинантной человеческой бета-глюкоцереброзидазой (имиглюцеразой), представляющей собой гликопротеин с молекулярной массой порядка 58 кДа.

Для того, чтобы перевести этот белок в активную форму, необходимо проводить энзиматическое отщепление остатков маннозы в составе олигосахаридов на каждом из сайтов гликозилирования имиглюцеразы. Для подтверждения биоаналогичности кандидатной молекулы референтной, мы провели их исследование широким набором физико-химических методов, включая масс-спектрометрический анализ.

Интактные белки исследовали при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ-масс-спектрометрии.

Валидацию аминокислотной последовательности, идентификацию и полуколичественный анализ посттрансляционных модификаций включая анализ гликопептидов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-танDEMной масс-спектрометрии высокого разрешения по стратегиям «снизу вверх» и «multiple attribute method» [2].

Идентификация и полуколичественный анализ свободных гликанов были выполнены методом быстрой гидрофильной ВЭЖХ с флуориметрическим и масс-спектрометрическим детектированием сигнала.

Все работы были выполнены с использованием жидкостного хроматографа Nexera X2 (Shimadzu), оснащенного диодно-матричным, флуориметрическим детекторами и масс-спектрометром Q-TOF 6550 (Agilent Technologies).

Нами было показано сходство профилей молекулярно-массового распределения между белками референтного и биоаналогичного препаратов, была подтверждена идентичность их аминокислотных последовательностей.

Проведенный сравнительный полуколичественный анализ профилей посттрансляционных модификаций, включая дезамидирование, окисление и двойное окисление, образование пироглутамовой кислоты и гликозилирование как на уровне гликопептидов, так и гликанов подтвердил близкое сходство между оригинальной и кандидатной молекулами.

Мы установили несколько большее содержание маннозо-3-содержащих гликанов в кандидатной мо-

лекуле, которое демонстрирует несколько более эффективное протекание процесса отщепления маннозы при производстве кандидатной молекулы в сравнении с оригинальной.

Также нами было подтверждена биоаналогичность других критических параметров качества между сравниваемыми препаратами.

Литература:

1. Gaucher Disease. URL: <https://emedicine.medscape.com/article/944157-overview> (дата обращения: 18.01.2007).
2. 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.

UDC 57.088.1

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF AN ORIGINAL AND BIOSIMILAR IMIGLUCERASE BY MASS SPECTROMETRY METHODS

M.Degterev, M.Smolov, A.Vishnevskiy, R.Shukurov

International Biotechnology Center Generium, Volginsky, Russia
601125, Vladimir region, Petushinsky district, Volginskiy village, Vladimirskaia str., 14
e-mail: degterev@ibcgenerium.ru

Key words: imiglucerase, biosimilarity, mass spectrometry, glycosylation

The deep characterization of the original (Cerezyme, Sanofi Genzyme) and candidate (Glurazyme, JSCGenerium) molecules of imiglucerase by hyphenated analytical techniques including UHPLC and HPLC-MS multiple attribute methods was done to compare them and to prove the biosimilarity.

The Gaucher disease is an orphan genetic disorder. It is caused by the lack of activity of the glucocerebrosidase and leads to the accumulation in cells a sphingolipid called glucocerebroside. Its symptoms include splenomegaly, thrombocytopenia, anemia, bruising, fatigue and various neurologic symptoms [1]. For the day, the principal treatment for this disease is the Enzyme replacement therapy by the recombinant human Beta-glucocerebrosidase (imiglucerase): a glycoprotein with molecular mass of about 58 kDa.

To transform the imiglucerase into the active form the mannose residues of the oligosaccharides at each glycosylation site are need to be exposed by several exoglycosidases. To prove the candidate protein biosimilarity we performed a physicochemical study including detailed mass spectrometry research.

Intact proteins were analyzed by the reversed phase HPLC-MS.

The amino acid sequence validation, PTMs identification and quantification including glycopeptide analysis were done with the high resolution RP-HPLC-MS/MS method under a bottom-up multiple attribute method concept [2].

The identification and semiquantitative analysis of glycans was made by the fast HILIC-MS with additional fluorimetric detection.

All work was performed with the Agilent 6550 QTOF mass spectrometer equipped with the Shimadzu Nexera X2 HPLC with diode-array and fluorometric detectors.

We showed the molecular mass profiles similarity between original and a new protein.

We proved the amino acid sequence identity between studied molecules.

We performed the comparative semiquantitative analysis of PTMs including deamidation, oxidation and dioxidation of methionine and tryptophan, pyroglutamic acid formation and glycosylation both on the glycopeptides and glycans level and demonstrated strong similarity between original and biosimilar molecules.

We showed a slightly bigger Man-3 glycans amount in the candidate molecule that does not affect the biosimilarity of the biologics but demonstrates the more effective mannose exposition process.

Moreover, we confirmed the similarity of critical quality attributes between them.

References:

1. Gaucher Disease. URL: <https://emedicine.medscape.com/article/944157-overview> (дата обращения: 18.01.2007).
2. 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.

СИМПОЗИУМ ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

SYMPOSIUM NEW GENERATION VACCINES

1. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ЧЕТЫРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА: НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СНИЖЕНИЮ СТОИМОСТИ И ПОДНЯТИЮ ПРИЕМЛИМОСТИ ВАКЦИНАЦИИ, N. Phanuphak, R. Ramautarsing, N. Teeratakulpisarn, S. Nonenoy, W. Kingkaew, T. Pankam, R. Meksen, S.J. Kerr, P. Phanuphak, J.M. Palefsky.....	305
ALTERNATIVE METHODS OF DELIVERY OF THE QUADRIVALENT HUMAN PAPILLOMAVIRUS VACCINE: NEW APPROACHES TO REDUCE COST AND INCREASE VACCINE ACCEPTABILITY, N. Phanuphak, R. Ramautarsing, N. Teeratakulpisarn, S. Nonenoy, W. Kingkaew, T. Pankam, R. Meksen, S.J. Kerr, P. Phanuphak, J.M. Palefsky.....	306
2. АТТЕНУИРОВАННЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ ГМ-КСФ ЧЕЛОВЕКА, КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН, Ткачёва А. В., Гражданцева А. А., Зайнутдинов С. С., Кочнева Г. В.....	307
ATTENUATED RECOMBINANT STRAIN OF VACCINIA VIRUS PRODUCING HUMAN GM-CSF AS A PLATFORM FOR ANTICANCER VACCINES, Tkacheva A.V., Grazhdantseva A.A., Zainutdinov S.S., Kochneva G.V.....	308
3. ДНК-ИММУНИЗАЦИЯ ПРОТИВ RT ВИЧ-1 ПРЕДОТВРАЩАЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ RT НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ, Баюрова Е.О., Стародубова Е.С., Петков С., Янсонс Ю., Межале Д., Фридрихсоне И., Подшвайт П., Городничева Т.В., Абакумов М.А., Гордейчук И.В., Исагулянц М.Г.....	309
DNA IMMUNIZATION WITH HIV-1 RT PREVENTS FORMATION OF RT-EXPRESSING TUMORS IN MOUSE MODEL, Bayurova E.O., Starodubova E.S., Petkov S., Jansons J., Mezale D., Fridrihsone I., Podschwadt P., Gorodnicheva T.V., Abakumov M.A., Gordeychuk I.V., Isagulians M.G.....	310
4. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАНДИДАТНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА P17, Акулова Е.Б., Аль-Шехадат Р.И., Захаров М.С., Козлов А.П.....	311
PRECLINICAL STUDY OF THE ANTI-HIV-1 CANDIDATE THERAPEUTIC VACCINE BASED ON HIV-1 RECOMBINANT P17 PROTEIN, Akulova E.B., Al-Shekhadat R.I., Zakharov M.S., Kozlov A.P.....	312
5. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАРМОЗЕТ КАК ПРИМАТНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, Гордейчук И.В., Тухватулин А.И., Петков С.П., Абакумов М.А., Гуляев С.А., Тухватулина Н.М., Гуляева Т.В., Михайлов М.И., Логунов Д.Ю., Исагулянц М.Г.....	313
IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COMMON MARMOSSETS AS A PRIMATE MODEL FOR PRECLINICAL TESTING OF IMMUNOBIOLOGICAL DRUGS, Gordeychuk I.V., Tukhvatulin A.I., Petkov S.P., Abakumov M.A., Gulyaev S.A., Tukhvatulina N.M., Gulyaeva T.V., Mikhailov M.I., Logunov D.Y., and Isagulians M.G.	314
6. ИСКУССТВЕННЫЕ БЕЛКИ-ИММУНОГЕНЫ, ИНДУЦИРУЮЩИЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА К ВИЧ-1, Карпенко Л.И., Рудометов А.П., Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Каплина О.Н., Ильичев А.А.....	315
ARTIFICIAL PROTEINS TO INDUCE HIV-1 NEUTRALIZING ANTIBODIES, Karpenko L.I., Rudometov A.P., Andreeva N.B., Chikaev A.N., Kaplina O.N., Ilyichev A.A.	316
7. ИСКУССТВЕННЫЕ Т И В КЛЕТОЧНЫЕ ИММУНОГЕНЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВАКЦИН, Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Бажан С.И.....	316
ARTIFICIAL T AND B CELL IMMUNOGENS AS THE BASIS FOR THE DEVELOPMENT OF PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINES, Ilyichev A.A., Karpenko L.I., Bazhan S.I.....	317
8. КОНСЕНСУСНЫЕ МУЛЬТИГЕННЫЕ ДНК ВАКЦИНЫ - УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ СОЗДАНИЯ МИКРОБНЫХ ВАКЦИН БУДУЩЕГО, Гордейчук И.В., Янсонс Ю., Скрастина Д., Латанова А.А., Стародубова Е.С., Петков С., Исагулянц М.Г.....	317
CONSENSUS MULTIGEN DNA VACCINES, UNIVERSAL INSTRUMENT FOR DESIGN OF FUTURE MICROBIAL VACCINES, I.Gordeychuk, J. Jansons, D.Skrastina, A.A. Latanova, E. Starodubova, S. Petkov, M. Isagulians.....	319
9. МУКОЗАЛЬНАЯ ВАКЦИНА СО ВСТРОЕННЫМ АДЬЮВАНТОМ ПРОТИВ ДИСБИОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА, Сао Пут, Сеол Хи Хонг, Ши Юн Ли, Джун Хэн Ри.....	321
A BUILT-IN ADJUVANT-ENGINEERED MUCOSAL VACCINE AGAINST DYSBIOTIC PERIODONTAL DISEASES, Sao Puth, Seol Hee Hong, Shee Eun Lee, Joon Haeng Rhee.....	321
10. НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ, Ю.М. Васильев.....	322
NEXT GENERATION INFLUENZA VACCINES: CHALLENGES AND PERSPECTIVES, Y.M. Vasiliev.....	323

11. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В-ТИПА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОПИАТНОЙ ЗАВИСИМОСТИ, Трофимов А.В., Гамалея Н.Б., Ульянова Л.И., Рак А.Я., Берзина А.Г., Горбунов Н.П., Родин С.В., Ищенко А.М.	324
PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES OF B-TYPE TO USE AS POTENTIAL VACCINE AGAINST OPIOID ADDICTION, Trofimov A.V., Gamaleya N.B., Uyanova L.I., Rak A.Ya., Berzina A.G., Gorbunov N.P., Rodin S.V., Ischenko A.M.	325
12. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ БОЛЬШИХ ОБЪЕМОВ ОБЩЕДОСТУПНЫХ ДАННЫХ, Осолодкин Д.И.	326
ANTIVIRAL ACTIVITY PREDICTION FOR SMALL MOLECULES BASED ON BIG PUBLIC DATA, Osolodkin D.I.	326
13. РАЗРАБОТКА И КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ, Козлов А.П., Аль-Шехадат Р.И., Акулова Е.Б., Мурашев Б.В., Веревошкин С.В., Машарский А.Э., Поддубный В.А., Востокова Н.В., Лиюзов Д.А.	327
DEVELOPMENT AND CLINICAL TRIALS OF HIV DNA VACCINE, Kozlov A.P., Al-Shekhadat R.I., Akulova E.B., Murashev B.V., Verevoshkin S.V., Masharsky A.E., Poddubnyy V.A., Vostokova N.V., Lioznov D.A.	327
14. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ФЛАВИВИРУСНЫХ ВАКЦИН, Карганова Г.Г.	328
MODERN APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF FLAVIVIRUS VACCINES, Karganova G.G.	329

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ЧЕТЫРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА: НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СНИЖЕНИЮ СТОИМОСТИ И ПОДНЯТИЮ ПРИЕМЛИМОСТИ ВАКЦИНАЦИИ

N. Phanuphak, R. Ramautarsing, N. Teeratakulpisarn, S. Nonenoy, W. Kingkaew, T. Pankam, R. Meksen, S.J. Kerr, P. Phanuphak, J.M. Palefsky

Тайский Исследовательский Центр СПИДа Красного Креста, Университет Калифорнии, Сан Франциско
e-mail: Joel.palefsky@gmail.com

Вакцинация против вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокоэффективна, но ее использование во многих странах ограничено из-за высокой стоимости вакцины и отсутствия возможности провести полный цикл вакцинации. Мы изучили два новых подхода к доставке четырехвалентной вакцины против ВПЧ для уменьшения боли, связанной с использованием иглы: 1) путем внутримышечной струйной инъекции; 2) путем внутрикожной струйной (джет) инъекции, позволяющей также снизить дозу вакцинного препарата, необходимую для вакцинации. Титры анти-ВПЧ антител при внутрикожной и внутримышечной джет-вакцинации были ниже, чем достигаемые при стандартной схеме введения иглой, но тем не менее могут оказаться достаточными для обеспечения протективного ответа. Использование джет-вакцинации может улучшить приемимость вакцины.

Ключевые слова: вирусы папилломы человека, внутрикожное введение, доставка джет-инжектором, вакцина

Вакцинация четырехвалентной вакциной против ВПЧ (qHPV) является безопасным и высокоэффективным методом предотвращения начальной инфекции ВПЧ 6, 11, 16 и 18. Несмотря на преимущества, которые дает снижение риска развития рака шейки матки, использование вакцины во многих странах ограничено ее высокой стоимостью и стандартной схемой вакцинации, предполагающей 2-х или 3-х разовое внутримышечное введение иглой. Некоторые люди не заканчивают серию вакцинации из-за ее болезненности и/или боязни укола иглой. Для внутрикожной (ID) доставки посредством струйной инъекции (JI) требуется только 20% от стандартной дозы вакцины, используемой для внутримышечной (IM) доставки. Такой способ введения может снизить стоимость вакцинации. Использование вместо иглы струйной инъекции (JI) может улучшить приверженность и проведение полной схемы вакцинации. Мы сравнили уровни сероконверсии и средние геометрические концентрации (GMC) анти-ВПЧ антител после введения qHPV IM в стандартной дозе путем укола (NS-IM), IM в стандартной дозе посредством JI (JI-IM) и ID в уменьшенной дозе (JI-ID).

Мы провели рандомизированное, неслепое исследование 150 условно здоровых тайских женщин в возрасте от 18 до 26 лет на предмет доказательства не меньшей эффективности струйных методов

введения qHPV по сравнению со стандартным методом.

Женщины были рандомизированы 1: 1: 1 в группах: I – инъекция стандартной дозы (0,5 мл) иглой (NS-IM); II – введение стандартной дозы IM с использованием устройства Pharmajet Stratis® (JI-IM); III – введение уменьшенной дозы (0,1 мл) ID с использованием устройства PharmaJet Tropis® (JI-ID). Вакцину вводили трижды с повторами через 2 и 6 месяцев. Анализ уровня антитела к ВПЧ-6/11/16/18 проводили в начале исследования и через месяц после последнего введения вакцины (Merck IgG). Доказательством меньшей эффективности JI-IM и JI-ID способов вакцинации служило достижение GMC-коэффициента (GMCR) NS-IM/ JI-IM и NS-IM/ JI-ID <1,5 NS-IM.

Средний возраст женщин составлял 23,7 года. От 95% до 100% ранее неинфицированных ни одним из входящих в вакцину типов ВПЧ образовали анти-ВПЧ антитела (сероконвертировали). Показатели сероконверсии в первичной конечной точке исследования на 7ом месяце, полученные в каждой из трех групп не различались. Для всех компонентов вакцины GMCR JI-IM не уступала GMC NS-IM. Для JI-ID пути величины GMCR были ниже, чем для NS-IM для HPV-6 (1,71), HPV-11 (1,53) и HPV-16 (1,69), но не для HPV-18 (1,33). При JI-ID вакцинации концентрация антител к HPV-16 были примерно вдвое ниже, чем концентрации анти-ВПЧ 16, выработанных в ответ на NS-IM вакцинацию. Во всех 3 группах вакцина переносилась хорошо и не вызывала серьезных побочных эффектов.

Введение qHPV вакцины методами струйной внутримышечной и внутрикожной инъекций привело к высокому уровню сероконверсии. Все методы обеспечивали образование анти-qHPV антител в высоком титре, хотя введение вакцины JI-ID и уступало стандартному введению NS-IM по уровню антительного ответа. JI-ID и JI-IM методы вакцинации могут быть использованы для повышения приверженности процессу вакцинации и снижению ее стоимости. Способность описанных путей вакцинации обеспечить защиту от инфекции HPV-6, 11, 16 и 18 нуждается в дополнительных исследованиях эффективности.

ALTERNATIVE METHODS OF DELIVERY OF THE QUADRIVALENT HUMAN PAPILLOMAVIRUS VACCINE: NEW APPROACHES TO REDUCE COST AND INCREASE VACCINE ACCEPTABILITY

N. Phanuphak, R. Ramautarsing, N. Teeratakulpisarn, S. Nonenoy, W. Kingkaew, T. Pankam, R. Meksen, S.J. Kerr, P. Phanuphak, J.M. Palefsky

*The Thai Red Cross AIDS Research Center and the University of California San Francisco
e-mail: Joel.palefsky@gmail.com*

Human papillomavirus vaccination is highly effective but its uptake is limited in many countries due to high cost and lack of completion of the full vaccination series. We studied 2 novel approaches to delivering the quadrivalent HPV vaccine: 1) intradermal jet injection to reduce the amount of vaccine needed and reduce pain associated with needle injection, and 2) intramuscular jet injection to reduce pain associated with needle injection. Titers were lower with intradermal and intramuscular jet injection than with the standard needle-administered regimen but may be high enough to confer clinical protection, and may improve vaccine uptake.

Key words: human papillomavirus, intradermal delivery, jet injector delivery, vaccine

Vaccination with the quadrivalent human papillomavirus (qHPV) vaccine is a safe and highly effective method of preventing initial infection with HPV 6, 11, 16 and 18. Despite its benefits for reduction of cervical cancer, vaccine uptake is limited in many countries by the high cost of the standard 2- or 3-dose intramuscular needle injection regimen. Some individuals do not complete the vaccination series due to local pain or fear of needles. Intradermal (ID) delivery by jet injection (JI-ID) requires only 20% of the vaccine volume used for intramuscular (IM) delivery and may reduce the cost of vaccination. Jet injection (JI) instead of needles may improve completion of vaccine regimens. We compared seroconversion rates and geometric mean concentrations (GMCs) following (qHPV) administration by standard-dose needle-syringe intramuscular (NS-IM), standard-dose IM by JI (JI-IM) and reduced-dose JI-ID routes.

150 healthy Thai women aged 18-26 years were randomized 1:1:1 in a randomized, unblinded, non-inferiority study to: Arm I – standard dose (0.5 mL) NS-IM; Arm II – standard dose JI-IM injection using the Pharmajet Stratis® device; and Arm III – reduced dose (0.1 mL) JI-ID injection using the PharmaJet Tropis® device. Vaccine was given at 0, 2 and 6 months. The Merck IgG assay for HPV-6/11/16/18 antibodies was performed at baseline and 7 months. Non-inferiority for Arms JI-IM and JI-ID was defined as GMC-ratio (GMCR) <1.5 of NS-IM.

Median age was 23.7 years. Between 95% and 100% of women naïve to vaccine types seroconverted. There was no statistical difference in seroconversion rates between arms at the primary endpoint at month 7. The GMCR of JI-IM was non-inferior to the GMC of NS-IM for all vaccine types. The GMCRs of JI-ID were inferior to NS-IM for HPV-6 (1.71), HPV-11 (1.53) and HPV-16 (1.69) but not for HPV-18 (1.33). JI-ID HPV-16 concentrations were approximately half those of NS-IM. The vaccine was well tolerated in all 3 arms and there were no vaccine-related serious adverse events.

High seroconversion rates were achieved with JI-IM and JI-ID qHPV delivery. JI-ID was inferior to NS-IM delivery, but concentrations for all vaccine types were high in all 3 arms. JI-ID and JI-IM may be valuable in improving vaccine compliance and reducing cost. Efficacy studies are needed to confirm the efficacy of these regimens.

УДК 615.371, 578.28

АТТЕНУИРОВАННЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ ГМ-КСФ ЧЕЛОВЕКА, КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН

Ткачёва А. В., Гражданцева А. А., Зайнутдинов С. С., Кочнева Г. В.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559,
Кольцово, Россия
e-mail: tkacheva_av@mail.ru

Получен штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-dGF с делециями двух генов вирулентности и встройкой гена ГМ-КСФ человека. Штамм VV-GMCSF-dGF продемонстрировал высокую адресную онколитическую активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: вирус осповакцины, ГМ-КСФ, онколитическая активность

Вирус осповакцины (vaccinia virus, VACV) обладает природными онколитическими свойствами, однако для получения противоопухолевых препаратов необходимо провести аттенуацию вируса, чтобы избежать возможных постинфекционных осложнений. Целесообразно также проводить встройку трансгенов с целью направленной модификации вируса. Мы сконструировали аттенуированный VACV на основе российского штамма Л-ИВП [1] путем введения делеций в два вирусных гена – фактора вирулентности: ген тимидинкиназы (*tk*) и ген вирусного ростового фактора (*vgf*). Сочетанное подавление генов *tk* и *vgf* приводит к ингибированию репликации вируса в неделящихся клетках [2]. Мы также использовали встройку трансгена ГМ-КСФ для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа [3].

Штамм VV-GMCSF-dGF продуцирует секретлируемый биологически активный ГМ-КСФ с эффективностью 1-40 мкг/мл среды в зависимости от типа клеток млекопитающих. Биологическую активность ГМ-КСФ оценивали по уровню стимуляции пролиферации клеток эритролейкоза человека TF-1 [4].

Для оценки цитотоксической активности штамма VV-GMCSF-dGF *in vitro* мы использовали 6 культур клеток опухолей человека различного генеза: А-549, H1299 – рак легкого; BT-549, BT-20 – рак молочной железы; U87MG – глиобластома; А-431 – карцинома кожи, и две культуры клеток нормальных тканей человека: MCF10A – нормальный эпителий молочной железы человека и LECH-240 – клетки легкого эмбриона человека. Было показано, что цитотоксическая активность штамма VV-GMCSF-dGF в отношении нормальных клеток значимо ниже, чем в отношении раковых ($P < 0,05$). Индекс онкоселективности, рассчитанный как отношение CTD_{50} (50%-ая цитотоксическая доза) в нормальных клетках к раковым, составляет более 30 для клеток LECH-240 и более 250 для клеток MCF10A.

Исследование противоопухолевой активности *in vivo* штамма VV-GMCSF-dGF было проведено на мышах линии nude с ксенографтами карциномы молочной железы BT-549, клетки которой наиболее чувствительны к вирусу. На 8-12 сутки после интратуморального введения штамма VV-GMCSF-dGF титр вируса составлял 10^8 БОЕ/мл 10%-ного гомогената опухоли, что свидетельствует об интенсивной его репродукции. Размер ксенографтов у мышей, «леченных» штаммом VV-GMCSF-dGF, не превышал 250 мм³, что в 3 раза меньше размера ксенографтов контрольной группы (750-800 мм³) в этот же временной период. Мы также показали, что экспрессия гена ГМ-КСФ стимулирует миграцию моноцитов, гранулоцитов, макрофагов и натуральных киллеров в разрушенную вследствие репродукции вируса VV-GMCSF-dGF опухолевую ткань (накопление CD11b-позитивных клеток в ксенографтах). Это свидетельствует об иммуностимулирующей активности ГМ-КСФ в составе штамма VV-GMCSF-dGF.

Таким образом, штамм VV-GMCSF-dGF селективно и с высокой активностью реплицируется в опухолевых клетках человека и является перспективной платформой для получения на его основе онколитических иммуностимулирующих препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-29-09044\18.

Литература:

1. Shvalov A.N. et al. Complete genome sequence of vaccinia virus strain L-IVP // *Genome Announc.* 2016. Vol. 4, № 3.
2. McCart J.A., Bartlett D.L., Moss B. Combined Growth Factor-deleted And Thymidine Kinase-deleted Vaccinia Virus Vector // 078-573-499-195-511. 2007. Vol. US. P. B2.
3. Somasundaram C. Recent Advances and Current Status of GM-CSF as an Adjuvant in DNA Vaccines for Viral Diseases // *J. Investig. Genomics.* 2015. Vol. 2, № 3. P. 2–5.
4. Grazhdantseva A.A. et al. Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte-acrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. Vol. 52, № 7.

UDK 615.371, 578.28

ATTENUATED RECOMBINANT STRAIN OF VACCINIA VIRUS PRODUCING HUMAN GMCSF AS A PLATFORM FOR ANTICANCER VACCINES

Tkacheva A.V., Grazhdantseva A.A., Zainutdinov S.S., Kochneva G.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk, Russia, 630559, Koltsovo, Russia
e-mail: tkacheva_av@mail.ru

The strain of vaccinia virus VV-GMCSF-dGF with deletions of two virulence genes and the insertion of the human GM-CSF gene was obtained. Strain VV-GMCSF-dGF demonstrated high and targeted oncolytic activity in experiments *in vitro* and *in vivo*.

Key words: vaccinia virus, GM-CSF, oncolytic activity

Vaccinia virus (VACV) has natural oncolytic properties, however, to obtain anticancer drugs, it is necessary to attenuate the virus to avoid possible post-infectious complications. It is also advisable to carry out the insertion of transgenes with the aim of directed modification of the virus. We constructed attenuated VACV based on the Russian strain L-IVP [1] by introducing deletions into two viral genes, the virulence factors: the thymidine kinase (*tk*) gene and the viral growth factor (*vgf*) gene. The combined suppression of the *tk* and *vgf* genes leads to inhibition of virus replication in non-dividing cells [2]. We also used the insertion of the GM-CSF transgene to stimulate an antitumor immune response [3].

Strain VV-GMCSF-dGF produces secreted biologically active GM-CSF with an efficiency of 1-40 µg / ml of medium, depending on the type of mammalian cells. The biological activity of the GM-CSF was evaluated by stimulating human erythroleukemia TF-1 cell's proliferation [4].

To assess the cytotoxic activity of the VV-GMCSF-dGF strain *in vitro*, we used 6 cultures of human tumor cells of various origins: A-549, H1299 - lung cancer; BT-549, BT-20 - breast cancer; U87MG - glioblastoma; A-431 - carcinoma of the skin, and two cultures of normal human tissue cells: MCF10A, the normal human mammary epithelium, and LECH-240, the human lung embryo cells. It was shown that the cytotoxic activity of the VV-GMCSF-dGF strain in relation to normal cells is significantly lower than in relation to cancer cells ($P < 0.05$). The index of oncospecificity, calculated as the ratio of CTD₅₀ (50% cytotoxic dose) in normal to cancer cells, is more than 30 for LECH-240 cells and more than 250 for MCF10A cells.

The study of the VV-GMCSF-dGF antitumor activity *in vivo* was carried out on nude mice with BT-549 breast carcinoma xenografts, whose cells are most sensitive to the virus. At 8-12 days after intratumoral administration of the VV-GMCSF-dGF strain, the virus titer was 10⁸ PFU / ml of 10% tumor homogenate, which indicates an intense viral reproduction. The size of xenografts in mice "treated" with the VV-GMCSF-dGF strain did not exceed 250 mm³, which is 3 times smaller than the size of the xenografts of the control group (750-800 mm³) in the same time. We also showed that the expression of the GM-CSF transgene stimulates the migration of monocytes, granulocytes, macrophages and natural killer cells into the tumor tissue destroyed by the reproduction of the VV-GMCSF-dGF virus (accumulation of CD11b-positive cells in xenografts). This indicates the immunostimulating activity of GM-CSF, produced by the VV-GMCSF-dGF strain.

Thus, the VV-GMCSF-dGF strain replicates selectively and with high activity in human tumor cells and is a promising platform for creating oncolytic immunostimulating preparations based on it.

This work was supported by RFBR grant No. 18-29-09044\18.

References:

1. Shvalov A.N. et al. Complete genome sequence of vaccinia virus strain L-IVP // *Genome Announc.* 2016. Vol. 4, № 3.
2. McCart J.A., Bartlett D.L., Moss B. Combined Growth Factor-deleted And Thymidine Kinase-deleted Vaccinia Virus Vector // 078-573-499-195-511. 2007. Vol. US. P. B2.
3. Somasundaram C. Recent Advances and Current Status of GM-CSF as an Adjuvant in DNA Vaccines for Viral Diseases // *J. Invest. Genomics.* 2015. Vol. 2, № 3. P. 2–5.
4. Grazhdantseva A.A. et al. Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte-acrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. Vol. 52, № 7.

УДК 59.084

ДНК-ИММУНИЗАЦИЯ ПРОТИВ RT ВИЧ-1 ПРЕДОТВРАЩАЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ RT НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ

Баюрова Е.О.^{1,2}, Стародубова Е.С.^{1,3,4}, Петков С.³, Янсонс Ю.^{5,6}, Межале Д.⁵, Фридрихсоне И.⁵, Подшвадт П.³, Городничева Т.В.⁷, Абакумов М.А.¹, Гордейчук И.В.^{1,2,3,8}, Исагулянц М.Г.^{1,2,3,5}

¹Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, 123098, Российская Федерация, город Москва, ул. Гамалеи, дом 18

²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова, Москва, Россия;

³Кафедра микробиологии, опухолевой и клеточной биологии Каролинского университета, Стокгольм, Швеция;

⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия;

⁵Рижский университет им. Страдыня, Рига, Латвия;

⁶Латвийский биомедицинский научно-исследовательский центр, Рига, Латвия;

⁷Евроген, Москва, Россия

⁸Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия.

Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия
e-mail: ekaterinapankova48135@gmail.com

Разработана модель оценки эффективности прототипов ДНК-вакцин на основе клеточных линий, экспрессирующих различные вирусные антигены. Показана возможность защиты от образования опухолей, экспрессирующих обратную транскриптазу (RT) ВИЧ-1, с помощью ДНК-иммунизации.

Ключевые слова: ДНК вакцины, ВИЧ-1, обратная транскриптаза, модели испытания вакцин на основе раковых клеток

На данный момент для тестирования и оценки эффективности разрабатываемых вакцин против ВИЧ используются две основных модели: приматы [1] и гуманизированные мыши [2]. Актуальным остается вопрос разработки более доступных моделей.

Нами была создана консенсусная аминокислотная последовательность обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1 и синтезирован оптимизированный для экспрессии вариант ее гена (RT-A ДНК). Путем сайт направленного мутагенеза в данный ген были введены мутации устойчивости к нуклеозидным и нуклеозидным ингибиторам RT, и получены соответствующие гены (RT-An ДНК и RT-Ann ДНК; Евроген, Москва). Данные последовательности были использованы для лентивирусной трансдукции линии 4T1luc2 с различной множественностью инфекции. В последовательность ДНК RT-A, RT-An и RT-Ann были введены мутации, инактивирующие ферментативную активность. Полученные варианты (RT-Ai, RT-Ain, RT-Ainn ДНК) были клонированы в плазмидный вектор pVax1 и использованы в качестве прототипов ДНК-вакцин. Мыши линии BALB/c были иммунизированы согласно [3] по схеме прайм-буст с применением электропорации. На 40 день после первой иммунизации мышам подкожно вводили 1x10⁵ клеток субклона 4T1luc2, продуцирующего соответствующий вариант активной формы RT. Динамику формирования опухолей оценивали по физическим параметрам и с помощью фиксации *in vivo* биолюминесценции (Spectrum CT, Living Image 4.4). На 20 день после имплантации клеток мыши были выведены из эксперимента. Органы вырезали и использовали для оценки *ex vivo* биолюминесценции. Развитие RT-специфического ИНФ-γ/ИЛ-2 иммунного ответа оценивали путем стимуляции спленоцитов пептидами из состава RT с детекцией цитокин-секретирующих клеток с помощью Флуороспота (Mabtech).

В результате ДНК-иммунизации наблюдалось предотвращение развития опухолей, продуцирующих соответствующий антиген. Иммунизация конструктором, кодирующим RT-Ai с последующим введением

клеток 4T1luc2_RT-A клон 5.3, защищала от развития опухолей до 60% мышей (в 6 из 10 сайтах введения раковых клеток). В тоже время, при введении 4T1luc2_RT-A клон 1.3, продуцирующего меньше RT, было защищено только 20% мышей (в 3 из 10 сайтов введения). ДНК-иммунизация лекарственно устойчивым вариантом RT-Ain защищала от роста соответствующих опухолевых клеток 4T1luc2_RT-Ain клон 10.1 до 80% животных (в 8 из 10 сайтов). При ДНК-иммунизации лекарственно устойчивым вариантом RT-Ainn предотвратить формирование опухолей не удалось, однако сформированные опухоли были достоверно меньше, чем у контрольной неиммунизированной группы и развивались позднее. Мыши, защищенные от развития опухолей, демонстрировали ИНФ-γ/ИЛ-2 иммунный ответ, специфичный к Т-клеточным эпитопам RT, распознаваемым иммунной системой мышей линии BALB/c.

Таким образом, в ходе работы мы разработали клеточную модель для оценки эффективности ДНК-вакцинных прототипов и показали, что иммунизация ДНК, кодирующей RT, способна предотвратить или замедлить развитие RT-экспрессирующих опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ 15_15_30039 в части создания иммуногенов, РФФИ №17_04_0583 и VACTRAIN #692293.

Литература:

1. Del Prete G. Q., Lifson J. D., Keele B. F. Nonhuman primate models for the evaluation of HIV-1 preventive vaccine strategies: model parameter considerations and consequences // *Curr Opin HIV AIDS*. -- 2016. -- Nov. -- T. 11, № 6. -- С. 546-554.
2. Gruell H., Klein F. Progress in HIV-1 antibody research using humanized mice // *Curr Opin HIV AIDS*. -- 2017. -- May. -- T. 12, № 3. -- С. 285-293.
3. Latanova A. A., Petkov S., Kilpelainen A., Jansons J., Latyshev O. E., Kuzmenko Y. V., Hinkula J., Abakumov M. A., Valuev-Elliston V. T., Gomelsky M., Karpov V. L., Chiodi F., Wahren B., Logunov D. Y., Starodubova E. S., Isaguliants M. G. Codon optimization and improved delivery/immunization regimen enhance the immune response against wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase, preserving its Th2-polarity // *Sci Rep*. -- 2018. -- May 24. -- T. 8, № 1. -- С. 8078.

UDC 59.084

DNA IMMUNIZATION WITH HIV-1 RT PREVENTS FORMATION OF RT-EXPRESSING TUMORS IN MOUSE MODEL

Bayurova E.O.^{1,2}, Starodubova E.S.^{1,3,4}, Petkov S.³, Jansons J.^{5,6}, Mezale D.⁵, Fridrihsone I.⁵, Podschwadt P.³, Gorodnicheva T.V.⁷, Abakumov M.A.¹, Gordeychuk I.V.^{1,2,3,8}, Isaguliants M.G.^{1,2,3,5}

¹Gamaleja Research Center of Epidemiology and Microbiology, Gamaleya st., 18, Moscow, 123098, Russian Federation

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and- Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

³Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden;

⁴Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia.

⁵Riga Stradins University, Riga, Latvia;

⁶Biomedical Research and Study Center, Riga, Latvia

⁷Evrogen, Moscow, Russia

⁸Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia.

N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, Moscow, Russia

e-mail: ekaterinapankova48135@gmail.com

Based on cell line expressing different viral antigens, a model for DNA-vaccine prototypes efficacy tests have been developed. It was shown that reverse transcriptase (RT) of HIV-1 expressing tumor formation can be prevented by specific RT DNA immunization.

Key words: DNA vaccines, HIV-1, reverse transcriptase, test systems for vaccines based on cancer cells

Nowadays two general models are used for testing the efficacy of newly developed vaccines against HIV: non-human primate [1] and humanized mice [2]. Development of new simple models are an actual task.

We generated a consensus aminoacid sequence of HIV-1 RT and synthesized an expression optimized variant of its gene (RT-A DNA). Mutations of drug resistance to nucleoside and non-nucleoside RT inhibitors were introduced in the gene by site-directed mutagenesis and corresponding genes were produced (RT-An DNA and RT-Ann DNA, Evrogen, Moscow). These sequences were used for lentiviral transduction of 4T1luc2 cell line with different multiplicities of infection. Inactivation mutations were introduced in RT-A, RT-An and RT-Ann DNA. Resulting variants

(RT_{Ai}, RT_{Ain}, and RT_{Ainn} DNA) were cloned into pVax plasmid vector and used as DNA vaccine prototypes. BALB/c mice were immunized according to [3] with a prime-boost regime and electroporation. 40 days after the prime 1x10⁵ cells of 4T1luc2 subclones, expressing the corresponding active RT, were subcutaneously injected into mice. Dynamics of a tumor growth was monitored by morphologic parameters and *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) (Spectrum CT, Living Image 4.4). 20 days following injections of the cells, the mice were sacrificed. Organs were excised and used for *ex vivo* BLI. RT-specific IFN- γ /IL-2 immune response to RT was assessed by stimulation of splenocytes with RT-derived peptide and cytokine secreting cell detection by FluoroSpot (Mabtech).

In result of DNA immunization, we monitored growth restriction of tumors, expressing the same type of antigen. Immunization with construct encoding RT_{Ai} following challenge with 4T1luc2_RT-A subclone 5.3 protected up to 60% of mice from tumor formation (6 out of 10 sites of cell injection were clean). Meanwhile injection of 4T1luc2_RT-A subclone 1.3 expressing less RT per cell, only 20% of mice were protected (3 out of 10 sites of injection). DNA immunization with RT_{Ain} drug resistant variant protected from growth of corresponding 4T1luc2_RT-A subclone 10.1 cells up to 80% of animals (8 out of 10 sites were clean). After immunization with RT_{Ainn} and all mice had tumors, but they were significantly smaller and were formed later than in control, nonimmunized group. Protected mice developed IFN- γ /IL-2 immune response specific to T-cell epitopes of RT, recognized by BALB/c mice immune system.

Thus, we developed a new cell line model for efficacy tests of DNA vaccine prototypes and showed that DNA immunization against RT can prevent the formation of RT expressing tumor formation.

The work was sponsored by Russian Science Foundation №15_15_30039 in immunogens construction part, RFBR №17_04_0583 and VACTRAIN #692293.

References:

1. Del Prete G. Q., Lifson J. D., Keele B. F. Nonhuman primate models for the evaluation of HIV-1 preventive vaccine strategies: model parameter considerations and consequences // *Curr Opin HIV AIDS*. -- 2016. -- Nov. -- T. 11, № 6. -- C. 546-554.
2. Gruell H., Klein F. Progress in HIV-1 antibody research using humanized mice // *Curr Opin HIV AIDS*. -- 2017. -- May. -- T. 12, № 3. -- C. 285-293.
3. Latanova A. A., Petkov S., Kilpelainen A., Jansons J., Latyshev O. E., Kuzmenko Y. V., Hinkula J., Abakumov M. A., Valuev-Elliston V. T., Gomelsky M., Karpov V. L., Chiodi F., Wahren B., Logunov D. Y., Starodubova E. S., Isagulyants M. G. Codon optimization and improved delivery/immunization regimen enhance the immune response against wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase, preserving its Th2-polarity // *Sci Rep*. -- 2018. -- May 24. -- T. 8, № 1. -- C. 8078.

УДК 615.37

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАНДИДАТНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА P17

Акулова Е.Б., Аль-Шехадат Р.И., Захаров М.С., 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, д.8.

e-mail: ekaterina.akul@gmail.com

Терапевтическая вакцина против ВИЧ-1 на основе белка p17 соответствует III классу малоопасных лекарственных препаратов. Препарат обладает специфической активностью, вызывая образование антител к белку p17, способных снижать экспрессию цитокинов Т-клетками после специфической стимуляции белком. Вакцина может быть рекомендована для проведения клинических исследований I фазы.

Ключевые слова: ВИЧ, СПИД, терапевтическая вакцина, доклинические исследования, белок p17 ВИЧ-1

Введение. Матриксный белок ВИЧ-1 p17 является одним из ключевых факторов иммунопатогенеза СПИДа, играющим важнейшую роль во всех этапах развития вируса и прогрессии заболевания. Взаимодействие матриксного белка со своим рецептором приводит к дерегуляции иммунной системы человека и созданию воспалительного микроокружения клеток, благоприятствующего размножению ВИЧ. Представляется перспективным использование рекомбинантного белка p17 в качестве антигена для индукции специфических антител, способных нейтрализовать влияние p17 на клетки иммунной системы.

Цель. Целью исследования являлось проведение доклинических исследований кандидатной терапевтической вакцины против ВИЧ-1 на основе белка р17.

Методы. доклинические исследования включали исследования острой токсичности и кумуляции, хронической токсичности, иммунотоксичности и местного действия, мутагенности и канцерогенности, аллергенности и пирогенности, репродуктивной токсичности, фармакокинетики, специфической активности. Исследования проводили на лабораторных животных: беспородные мыши, беспородные крысы, кролики породы шиншилла, морских свинок, мышах линии Balb/c, в зависимости от протокола каждого исследования.

Все эксперименты проводились в соответствии со стандартами Надлежащей лабораторной практики и гуманного обращения с животными.

Вся работа с животными соответствовала протоколам по использованию животных, утвержденным комиссией по этике института.

Результаты. В ходе проведения доклинических исследований было показано, что кандидатная терапевтическая вакцина против ВИЧ-1 на основе белка р17 безопасна и нетоксична для лабораторных животных. Не было выявлено острой и хронической токсичности, мутагенной и канцерогенной активности. Применение препарата не оказывает воздействия на генеративную функцию животных и не вызывает нарушений эмбрионального развития у потомства.

Препарат обладает умеренной анафилактикогенной активностью и является пирогенным при внутривенном введении кроликам в дозе 0,2 мл/кг, что необходимо учитывать при планировании клинических исследований.

Двукратная подкожная иммунизация мышей препаратом в дозе 12,5 мкг вызывает образование антител к белку р17 и его функционально значимым эпитопам. Синтезируемые антитела взаимодействуют с белком р17 и снижают экспрессию цитокинов Т-клетками в ответ на специфическую белковую стимуляцию.

Заключение/выводы. В соответствии с классификацией опасности лекарственных препаратов для клинического применения, кандидатная терапевтическая вакцина против ВИЧ-1 на основе белка р17 соответствует III классу малоопасных лекарственных препаратов. Препарат обладает специфической активностью, вызывая образование антител к белку р17, способных снижать экспрессию цитокинов Т-клетками после специфической стимуляции белком. Вакцина может быть рекомендована для проведения клинических исследований I фазы.

UDC 615.37

PRECLINICAL STUDY OF THE ANTI-HIV-1 CANDIDATE THERAPEUTIC VACCINE BASED ON HIV-1 RECOMBINANT P17 PROTEIN

Akulova E.B., Al-Shekhadat R.I., Zakharov M.S., 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.
e-mail: ekaterina.akul@gmail.com

The p17-based anti-HIV-1 candidate therapeutic vaccine corresponds to the III class of low-risk drugs in accordance with the classification of the dangerous medical products. The vaccine induces the synthesis of antibodies to p17 protein enabling to decrease the cytokine expression by T cells after specific protein stimulation. It can be recommended for Phase I clinical trial.

Key words: HIV, AIDS, therapeutic vaccine, preclinical trials, HIV-1 p17 protein

Background. The matrix protein HIV-1 p17 has been shown to be one of the key factors of AIDS immunopathogenesis, which plays a crucial role in all stages of the development of the virus and in disease progression. The interaction of the p17 protein with its receptors leads to the deregulation of the human immune system and the formation of an inflammatory microenvironment of cells which results in easier virus reproduction. The use of the recombinant p17 protein as an antigen to induce specific antibodies enable to block p17 influence on immune cells appears to be promising.

Aim. The objective of the study was to conduct the preclinical studies of p17-based anti-HIV-1 candidate

therapeutic vaccine.

Methods. Preclinical studies included experiments of toxicity and cumulation, chronic toxicity, immunotoxicity and local action, mutagenicity and carcinogenicity, allergenicity and pyrogenicity, reproductive toxicity, pharmacokinetics, specific activity. Depending on the protocol of each study experiments have been conducted on laboratory animals: outbred mice, outbred rats, rabbits, guinea-pigs, mice of the line Balb/c.

All experiments were conducted in accordance with GLP and the standards of humane treatment of animals. All the work with animals met the protocols on animal use approved by the institutional IACUC.

Results. In the preclinical studies p17-based anti-HIV-1 therapeutic vaccine was found to be safe and non-toxic. There were no acute and chronic toxicity, mutagenic and carcinogenic activity. The vaccine did not effect the generative function of animals and did not cause embryonic developmental disorders in the offspring.

The studied drug has moderate anaphylactogenic activity and is pyrogenic when administered intravenously to rabbits at a dose of 0.2 ml/kg, that needs to be taken into account when planning clinical trials in human.

Two-time subcutaneous immunization of mice at a dose of 12.5 ug induced the synthesis of antibodies to protein p17 and to its functional epitopes. Induced antibodies were able to interact with p17 protein and decrease the cytokine expression by T cells.

Conclusions. The p17-based anti-HIV-1 candidate therapeutic vaccine corresponds to the III class of low-risk drugs in accordance with the classification of the dangerous medical products. The vaccine induces the synthesis of antibodies to p17 protein enabling to decrease the cytokine expression by T cells after specific protein stimulation. It can be recommended for Phase I clinical trial.

УДК 59.084

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАРМОЗЕТ КАК ПРИМАТНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Гордейчук И.В.^{1,2,3}, Тухватулин А.И.², Петков С.П.⁴, Абакумов М.А.⁵, Гуляев С.А.¹, Тухватулина Н.М.², Гуляева Т.В.¹, Михайлов М.И.^{6,7}, Логунов Д.Ю.², Исагулянц М.Г.^{1,2,4,8}

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия;

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия;

³ Первый Московский Государственный Медицинский Университет им И.М. Сеченова, Москва, Россия;

⁴ Каролинский институт, Стокгольм, Швеция;

⁵ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

⁶ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия;

⁷ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия;

⁸ Рижский университет имени Страдыня, Рига, Латвия.

108819, Россия, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, стр. 1
e-mail: lab.gord@gmail.com

Обыкновенные мармозеты (*Callithrix jacchus*, CM) — маленькие приматы Нового Света, широко используемые в биомедицинских исследованиях, включая исследования вакцин. В данной работе мы представляем набор оптимизированных процедур для характеристики экспрессии иммуногенов и последующего адаптивного Т-клеточного иммунного ответа на мармозетах, а именно метод визуализации *in vivo* экспрессии иммуногена после иммунизации путем ДНК электропорации, а также панель антител для многопараметрической проточной цитометрии, позволяющую идентифицировать основные субпопуляции лимфоцитов и маркеры созревания и активации Т- и В-клеток.

Ключевые слова: моделирование вирусных инфекций, игрунковые обезьяны, ДНК-вакцины

Материалы и методы. Мармозетам А и В вводили внутрикожно в двух повторах по 10, 20 и 40 мкг ДНК плазмиды pVax, кодирующей ген люциферазы (pVaxLuc). Места инъекции подвергали электропорации с использованием пластинчато-вилочного электрода (BEX) с импульсом порации напряжением 400В и последующими тремя (А) или восемью (В) движущимися импульсами напряжением 100В с чередующейся полярностью (CUY21EditII, BEX Ltd.) (Latanova et al., 2018). Через 3, 72 и 120 часов мармозет вводили в

наркоз путем ингаляции 2,5% изофлуорана, внутривенно вводили люциферин (150 мг/кг; PerkinElmer), помещали в имеджер SpectrumCT (PerkinElmer) и измеряли уровень биoluminesценции.

Образцы гепаринизированной крови восьми мартосет были окрашены флуоресцентно меченными моноклональными антителами к популяционным маркерам (CD45, CD3, CD20, CD4, CD8; BioLegend, BD, Beckton Coulter) и маркерам созревания и активации лимфоцитов (CD69, CD62L, CD45RO, CD107a и CD27; BioLegend, BD) и анализировали с помощью проточной цитометрии (FACS Aria III, BD).

Результаты. Введение 10 мкг и 20 мкг pVaxLuc путем внутрикожной инъекции с последующей электропорацией с восемью движущимися импульсами (протокол, оптимизированный для мышей; Latanova et al., 2018) привело к пиковой экспрессии люциферазы через 72 часа с высокой остаточной яркостью через 120 часов. Уровень биoluminesценции после введения 20 мкг pVaxLuc был в 10 раз выше, чем от 10 мкг. Введение 40 мкг pVaxLuc приводило к перенасыщению сигнала с резким снижением эмиссии от 3 до 120 ч: уровень экспрессии люциферазы к 120 ч был равен уровню, генерируемому 10 мкг pVaxLuc. Более мягкий протокол иммунизации ДНК с тремя импульсами был неэффективен. Далее мы охарактеризовали иммунный статус не иммунизированных мартосет. В популяции CD45+ клеток 22,7±5,5% составляли CD3-CD20+, а 67,6±6,3% — CD3+CD20-. Субпопуляция CD3+ клеток включала 55,7±5,5% CD3+CD4+CD8- и 34,3±3,7% CD3+CD4-CD8+. Маркеры активации и созревания распределялись следующим образом: CD62L на 54,0±10,7% CD3+CD4+ и 74,4±12,1% CD3+CD8+ клеток; CD69 на 2,7±1,2% CD3+CD4+ и 1,2±0,5% CD3+CD8+ клеток; CD45RO на 1,6±0,6% CD3+CD4+ и 1,8±0,7% CD3+CD8+ клеток; CD107a на 0,7±0,5% CD3+CD4+ и 0,5±0,3% CD3+CD8+ клеток; CD27 на 94,6±2,1% CD3+ и 8,9±3,9% CD20+ клеток. Животные женского и мужского пола отличались по доле от клеток CD3+CD4+CD45RO+ (1,9±0,5 у самок против 1,1±0,2 у самцов; p<0,05). Было обнаружено, что процент клеток CD20+CD27+ сильно коррелирует с возрастом обезьян (r=0,923, p<0,005).

Закключение. Нами были разработаны методики ДНК-иммунизации и оценки иммунного статуса и адаптивного клеточного ответа у обыкновенных мартосет, необходимые для проведения профилактической и терапевтической ДНК-иммунизации.

UDC 59.084

IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF COMMON MARMOSSETS AS A PRIMATE MODEL FOR PRECLINICAL TESTING OF IMMUNOBIOLOGICAL DRUGS

Gordeychuk I.V.^{1,2,3}, Tukhvatulin A.I.², Petkov S.P.⁴, Abakumov M.A.⁵, Gulyaev S.A.¹, Tukhvatulina N.M.², Gulyaeva T.V.¹, Mikhailov M.I.^{6,7}, Logunov D.Y.², and Isaguliants M.G.^{1,2,4,8}

¹ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

² N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia;

⁴ Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden;

⁵ Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

⁶ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;

⁷ Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

⁸ Riga Stradins University, Riga, Latvia.

108819, Russian Federation, Moscow, premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement "Moskovskiy" e-mail: lab.gord@gmail.com

Common marmosets (*Callithrix jacchus*, CM) are small New World primates widely used in biomedical research including vaccine studies. In this work, we present a set of optimized procedures for characterization of the expression of immunogens and the consequent adaptive T-cellular immune response in CMs, namely a method of *in vivo* visualization of immunogen expression following DNA-immunization with electroporation, and multiparametric flow cytometry identifying the major subpopulations of lymphocytes and main markers of T- and B- cell maturation and activation.

Key words: modeling of viral infections, common marmosets, DNA vaccines

Materials and Methods. Common marmosets A and B were injected intradermally (id) each with 10, 20 and 40 µg of pVax DNA plasmid encoding luciferase gene (pVaxLuc), two repeats each dose. Immediately after, the injection sites were electroporated using a fork-plate electrode (BEX) with 400V poration pulse and three (A) or eight

(B) driving pulses of 100V with alternating polarity (CUY21EditII, BEX Ltd) (Latanova AA et al, 2018). After 3, 72 and 120 hours CMs were sedated by inhalation of 2.5% isoflurane, injected intraperitoneally with luciferin (150 mg/kg; PerkinElmer), placed into Spectrum CT imager (Perkin Elmer) and monitored for the emission of bioluminescence. Heparin-treated blood samples from eight common marmosets were stained with fluorescently labeled monoclonal antibodies to population markers (CD45, CD3, CD20, CD4, CD8; BioLegend, BD, Beckton Coulter) and lymphocyte maturation and activation markers (CD69, CD62L, CD45RO, CD107A and CD27; BioLegend, BD) and analyzed using flow-cytometry (FACS Aria III, BD).

Results. Introduction of 10 ug and 20 ug of pVaxLuc by id injection followed by electroporation with eight driving pulses (protocol optimized for mice; Latanova A et al, 2018) led to luciferase expression peaking at 72 hours, with high residual radiance at 120 hours. Photon emission from 20 ug of pVaxLuc was 10-times higher than from 10 ug. Introduction of 40 ug of pVaxLuc led to signal overload with sharp decrease of emission from 3 to 120 h: luciferase expression level by 120 h was equal to that generated by 10 ug of pVaxLuc. Mild DNA-immunization protocol with few pulses was ineffective. Next, we characterized the immune status of naïve CMs. Within the CD45+ population 22.7±5.5% were CD3–CD20+ and 67.6±6.3% were CD3+CD20–. CD3+ subpopulation included 55.7±5.5% CD3+CD4+CD8– and 34.3±3.7% CD3+CD4–CD8+. Activation and maturation markers were expressed as follows: CD62L on 54.0±10.7% of CD3+CD4+, and 74.4±12.1% of CD3+CD8+ cells; CD69 on 2.7±1.2% of CD3+CD4+, and 1.2±0.5% of CD3+CD8+ cells; CD45RO on 1.6±0.6% of CD3+CD4+ and 1.8±0.7% of CD3+CD8+ cells; CD107a on 0.7±0.5% of CD3+CD4+ and 0.5±0.3% of CD3+CD8+ cells; CD27 on 94.6±2.1% of CD3+ and 8.9±3.9% CD20+ cells. Female and male subjects differed in % of CD3+CD4+CD45RO+ cells (1.9±0.5 in females vs 1.1±0.2 in males; $p<0,05$). Percent of CD20+CD27+ cells was found to highly correlate with CM age ($r=0,923$, $p<0,005$).

Conclusion. Conditions for DNA-immunization and for assessment of the immune status and the adaptive cellular response in common marmosets have been established crucial for the performance of prophylactic and therapeutic DNA immunization in these animals.

ИСКУССТВЕННЫЕ БЕЛКИ-ИММУНОГЕНЫ, ИНДУЦИРУЮЩИЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА К ВИЧ-1

Карпенко Л.И., Рудометов А.П., Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Каплина О.Н., Ильичев А.А.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

Несмотря на то, что ВИЧ-1 является одним из наиболее изученных вирусных патогенов, эффективной вакцины против ВИЧ/СПИДа до сих пор нет. Не отрицая заметного прогресса в области разработки методов антиретровирусной терапии, позволяющих значительно продлевать жизнь ВИЧ-инфицированных, следует отметить, что они являются лишь паллиативным средством борьбы с вирусом и не способны остановить пандемию ВИЧ-1. И лишь широкое применение эффективной профилактической вакцины является единственно возможным способом предотвратить распространение ВИЧ-инфекции, а впоследствии и искоренить ее. Однако работа над вакциной сопряжена с определенными проблемами, которые хорошо известны. Это, прежде всего, высокая генетическая и, как следствие, антигенная изменчивость ВИЧ-1, позволяющая ему ускользать от защитного действия иммунной системы.

Ключевые слова: СПИД, ВИЧ, вакцины

Первый успех был связан с клиническими испытаниями RV 144 в Таиланде, которые показали, что использовавшаяся вакцина обеспечивала хотя и скромный, но достоверный уровень защиты (31%). Полученные результаты свидетельствуют о том, что вакцину создать можно, но необходимо проводить работу над повышением ее эффективности. Это диктует необходимость разработки новых технологий дизайна иммуногенов.

Оптимизма разработчикам вакцин против ВИЧ прибавило открытие антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении большинства известных первичных изолятов ВИЧ-1 (bNAbs). В связи с этим одним из перспективных направлений в создании новых ВИЧ-иммуногенов является получение скафолдов (каркасных белков), экспонирующих линейные эпитопы или их имитаторы, узнаваемые bNAbs, которые можно отобрать с помощью технологии фагового дисплея.

В качестве носителя в первую очередь рассматривали частицы бактериофага M13, экспонирующие пептиды, отобранные в результате аффинной селекции с bNAbs VRC01. Другим кандидатом в качестве

белка-носителя являлся белок YkuJ из *Bacillus subtilis*. Этот белок выбран с помощью компьютерного моделирования, его третичная структура совпадала со структурой эпитопов, узнаваемых bNAbs 10E8. Две копии фрагмента эпитопа, узнаваемого bNAbs 10E8, были встроены в YkuJ. Рекомбинантный белок был назван DNI. Ген, кодирующий белок DNI, был синтезирован и клонирован в составе плазмиды pET21a. В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат белка, пригодный для иммунизации лабораторных животных, который был охарактеризован с помощью ЭФ и иммуноблоттинга. Третий кандидат в качестве белка-носителя — ВПЧ HBcAg. Были получены химерные варианты HBcAg, несущие пептиды-имитаторы, узнаваемые NAb VRC01.

ARTIFICIAL PROTEINS TO INDUCE HIV-1 NEUTRALIZING ANTIBODIES

Karpenko L.I., Rudometov A.P., Andreeva N.B., Chikaev A.N., Kaplina O.N., Ilychev A.A.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Although HIV-1 is one of the best-characterized viruses, there is no efficient vaccine against this pathogen so far. Giving a credit for notable progress in approaches to antiretroviral therapy that considerably prolongs the lifespan of HIV-infected patients, it should be noted that they are only palliative means to control the virus and cannot stop HIV-1 pandemic. Only effective prophylactic vaccine is to prevent the spread of HIV infection, and consequently eradicate it. However, vaccine development is associated with particular well-known issues.

Key words: AIDS, HIV, vaccines

The first success was associated with clinical trials of RV 144 in Thailand, which showed that the vaccine provided a modest but reliable level of protection (31%). The results indicate that it is possible to create a HIV vaccine, but it is necessary to work on improving its effectiveness. This dictates the need to develop new technologies for the design of immunogens.

Optimism for HIV vaccine developers has been increased by the discovery of antibodies that have broadly neutralizing activity against most of the known primary HIV-1 isolates (bNAbs).

One of the promising approach in the creation of new HIV immunogens - is protein scaffolds. Such scaffolds can expose one or several epitopes of broadly neutralizing antibodies to provide the most efficient exposure of the desired epitopes to immune system.

As scaffold (carrier) we chose bacteriophage M13 particles, which exhibit peptide-mimics selected with the help of affinity selection with bNAbs VRC01. Another candidate carrier protein was YkuJ protein from *Bacillus subtilis*. This protein was selected using computer modeling, its tertiary structure was similar to the structure of epitope recognized by bNAbs 10E8. Two copies of the epitope fragment recognized by bNAbs 10E8 were inserted into YkuJ protein (modified protein was named DNI). The gene encoding the DNI protein was synthesized and cloned into the plasmid pET21a. The result was an electrophoretic homogeneous preparation of the protein, suitable for immunization of laboratory animals. The third candidate as a carrier protein was VLP HBcAg. Chimeric HBcAg particles carrying peptide imitators recognized by NAb VRC01 were obtained.

ИСКУССТВЕННЫЕ Т И В КЛЕТОЧНЫЕ ИММУНОГЕНЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВАКЦИН

Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Бажан С.И.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

Одним из подходов получения противовирусных вакцин является конструирование полностью искусственных полиэпитопных (мозаичных) иммуногенов, включающих широкий спектр протективных Т- и В-клеточных эпитопов из основных антигенов патогена, способных индуцировать образование нейтрализующих антител и ответы цитотоксических (CD8+ CTL) и хелперных (CD4+ Th) Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: иммуногены, вакцины

Такой подход представляется весьма привлекательным для создания профилактических вакцин против вирусных патогенов. Теоретически, он дает возможность сфокусировать иммунные ответы на протективные эпитопы патогена, а так же позволяет исключить из состава вакцины нежелательные антигенные детерминанты, которые способны индуцировать аутоантитела или антитела, увеличивающие инфекционность вируса. Такой подход весьма привлекателен и для иммунотерапии онкологических заболеваний, т.е. для создания противораковых вакцин способных настроить иммунную систему на уничтожение опухоли.

В докладе будет рассказано о нашем опыте по конструированию полиэпитопных Т и В – клеточных иммуногенов для разработки профилактических вакцин против вирусных и терапевтических вакцин против онкологических заболеваний.

ARTIFICIAL T AND B CELL IMMUNOGENS AS THE BASIS FOR THE DEVELOPMENT OF PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINES

Ilyichev A.A., Karpenko L.I., Bazhan S.I.

Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk region, Russian Federation

One of the approach to vaccine design and development based on artificial polyepitope (mosaic) immunogens, including a wide range of protective T and B cell epitopes from the main antigens of different pathogens capable of inducing of neutralizing antibodies and cytotoxic (CD8 + CTL) and helper (CD4 + Th) responses T lymphocytes. Such an approach seems to be very attractive for creating prophylactic vaccines against viral pathogens.

Key words: immunogens, vaccines

Theoretically, it makes it possible to focus the immune responses to the protective epitopes of the pathogen, as well as to exclude from the composition of the vaccine unwanted antigenic determinants that are able to induce autoantibodies or antibodies that increase the infectivity of the virus. Such an approach is also very attractive for immunotherapy of oncological diseases, i.e. to create immunogens capable of setting up the immune system to destroy the tumor.

КОНСЕНСУСНЫЕ МУЛЬТИГЕННЫЕ ДНК ВАКЦИНЫ – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ СОЗДАНИЯ МИКРОБНЫХ ВАКЦИН БУДУЩЕГО

Гордейчук И.В.^{1,2,3}, Янсонс Ю.^{4,5}, Скрастина Д.⁵, Латанова А.А.^{3,6}, Стародубова Е.С.^{6,7}, Петков С.^{6,7}, Исагулянц М.Г.^{1,3,4}

¹ФНИЦИРИП им М.П. Чумакова РАН, Москва;

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва;

³Национальный Исследовательский Центр Эпидемиологии и Микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва;

⁴Рижский университет им. Страдина, Рига;

⁵Центр биомедицинских исследований и обучения, Рига;

⁶Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва;

⁷Департамент микробиологии, опухолевой и клеточной биологии, Каролинский институт, Стокгольм
e-mail: maria.issagouliantis@rsu.lv

ДНК является быстро развивающейся платформой для создания новых вакцин против инфекционных и неинфекционных заболеваний. Исследования по оптимизации дизайна, доставки и иммуногенности ДНК-вакцин привели к заметному повышению их эффективности для крупных животных и человека. В этой презентации будут рассмотрены принципы, используемые при создании ДНК-вакцин против микробных инфекций и связанных с ним форм рака, прогресс в их разработке и опыт применения экспериментальных ДНК-вакцин. Будет дан обзор методов, используемых при конструировании ДНК-иммуногенов, их доставке, *in vivo* экспрессии одиночных генов и их смесей и подходов к скринингу иммунного ответа, а также его прогнозированию его с помощью *in vitro* тестов и *in vivo* методов, основанные на технике визуализации биолюминесценции.

Ключевые слова: ДНК-вакцина, ген белкового консенсуса, доставка, электропорация, экспрессия, иммунный ответ

ДНК-иммуногены представлены плазмидами или кольцевой мини-ДНК, кодирующими белки, которые предполагается экспрессировать в организме вакцинируемого с целью выработки иммунного ответа. Качество и сила этого ответа зависят от последовательности ДНК-иммуногена, а для мультигенных вакцин - от их состава, а также участка, метода и средств доставки ДНК и возможных адъювантов. ДНК в основном синтетические для обеспечения высокого уровня экспрессии. Современные ДНК-вакцины не нуждаются в генетическом материале микробов, а используют синтетические гены, кодирующие адаптированные иммуногены, что дает ряд существенных преимуществ. Во-первых, для создания таких синтетических иммуногенов требуется только информация о генетической последовательности микробного антигена, широко доступная для современной микробиологии. Во-вторых, это позволяет удалять опасные домены и добавлять домены, потенцирующие иммунный ответ. В-третьих, для вакцин против высоковариабельных патогенов открывается возможность создания консенсусных иммуногенов, адекватно репрезентирующие основные свойства микробных антигенов, в частности, их иммунодоминантные эпитопы для индукции эффективного антимикробного иммунного ответа.

Иммуногенность ДНК-вакцины определяется процессингом и презентацией закодированного антигена [1,2]. Этими процессами можно легко манипулировать. Обычно антиген, синтезированный в клетке-хозяине, процессируется протеасомой, загружается и представляется в комплексе с молекулами МНС класса I. Однако, он может быть перенаправлен в лизосому или секретирован для последующего представления в комплексе с МНС класса II. Мы протестировали оба подхода с использованием панели таких сигналов. Лучшими были сигналы направления на процессинг мембранного белка I, ассоциированного с лизосомой, обеспечивающего представление антигена в комплексе с молекулой МНС класса II, слияние с ними индуцировало сбалансированный Th1/Th2-иммунный ответ; флавиовирусный лидерный пептид оказался менее эффективным [3,4].

Иммуногенность зависит от метода, используемого для доставки и от участка доставки ДНК тканей и клеток, первыми экспрессирующими иммуноген, а также уровня его экспрессии. ДНК-вакцины могут быть доставлены внутримышечно, подкожно, внутрикожно или путем инвазивного или неинвазивного аппликации на слизистые. Интенсивные дебаты о плюсах и минусах различных маршрутов доставки продолжаются до сих пор. Зависимость иммунного ответа, вызванного иммунизацией одним или несколькими генами, от методов доставки была изучена рядом исследователей. По некоторым данным, путь доставки определял иммуногенность, по другим, он определял уровень ответа, но не его специфичность или Th-полярность. Наши данные подтверждают последнее [2]. Недавний бум в применении ДНК-вакцин был связан с электропорацией, которая повысила эффективность доставки ДНК *in vivo* в 1000 раз, а также обеспечила адъювантный эффект за счет локального воспаления. Мы оптимизировали процесс электропорации отдельных ДНК-иммуногенов и их смесей в грызунах, с успешной индукцией специфического иммунного ответа [1]. Было показано отсутствие конкуренции консенсусных ДНК-иммуногенов при их доставке в виде смесей. Это упрощает разработки микробных вакцин, направленных одновременно против нескольких мишеней.

ДНК-вакцины часто вызывают сильный клеточный иммунный ответ, имитирующий события, происходящие при микробных, особенно вирусных, инфекциях. Иммунный ответ можно оценивать множеством методов, включая одно- и дву-цитокинный Fluorospot, многопараметрическую проточную цитофлуориметрию FACS, ИФА или Luminex для оценки секретируемых цитокинов и антител ИФА. Мы также разработали минимально инвазивный суррогатный метод оценки интегрального иммунного ответа у мелких живых животных *in vivo* [1, 5]. При этом ДНК иммуногена вводят в виде смеси с плазмидой, кодирующей фермент люциферазу. Наличие клеток, экспрессирующих люциферазу, оценивают с помощью биолуминесцентной *in vivo* визуализации. Иммунный ответ, вызванный ДНК иммуногеном, убивает клетки, ко-экспрессирующие иммуноген и люциферазу, что регистрируется как потеря биолуминесцентного сигнала в участках введения ДНК. Метод может быть использован для выявления иммунного ответа против ДНК-иммуногенов, даже когда их эпитопы неизвестны. Кроме того, мы разработали подход к прогнозированию иммуногенности плазмидной ДНК путем оценки способности закодированного в ней антигена индуцировать окислительный стресс и реакцию на него стресс в трансфицированных клетках *in vitro* [6], Jansons J et al, Cells 2018 послано в печать. Оба метода позволяют мониторировать иммунный ответ и эффективны для оценки мультигенных ДНК-вакцин с минимальным использованием животных в соответствии с 3R-принципами экспериментов на животных. Мы применили эти подходы при разработке кандидатной мультигенной ДНК-вакцины против лекарственной устойчивости при ВИЧ-инфекции и раке печени, связанном с вирусным гепатитом С и их тестировании на мышинных моделях. Недавно было показано, что этот подход работает и в модели простейших нечеловекообразных приматов [7].

Благодарности: Российский научный фонд №15-15-30039; Российский фонд фундаментальных исследований №17_04_00583; EC Twinning VACTRAIN, контракт №692293 и проект L郑-20182-0308.

Литература:

1. Petkov S, Starodubova E, Latanova A, Kilpeläinen A, Latyshev O, Svirskis S, Wahren B, Chiodi F, Gordeychuk I, Isaguliantis M. DNA immunization site determines the level of gene expression and the magnitude, but not the type of the induced immune response. *PLoS One* —2018. V. —13. № — 6. —e0197902.
2. Latanova AA, Petkov S, Kilpeläinen A, Jansons J, Latyshev OE, Kuzmenko YV, Hinkula J, Abakumov MA, Valuev-Elliston VT, Gomelsky M, Karpov VL, Chiodi F, Wahren B, Logunov DY, Starodubova ES, Isaguliantis MG. Codon optimization and improved delivery/immunization regimen enhance the immune response against wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase, preserving its Th2-polarity. *Sci Rep.* —2018. V. —8. № — 1. —doi: 10.1038/s41598-018-26281-z.
3. Latanova A, Petkov S, Kuzmenko Y, Kilpeläinen A, Ivanov A, Smirnova O, Krotova O, Korolev S, Hinkula J, Karpov V, Isaguliantis M, Starodubova E. Fusion to Flaviviral Leader Peptide Targets HIV-1 Reverse Transcriptase for Secretion and Reduces Its Enzymatic Activity and Ability to Induce Oxidative Stress but Has No Major Effects on Its Immunogenic Performance in DNA-Immunized Mice. *J Immunol Res.* —2017. V. —2017:7407136.
4. Starodubova ES, Isaguliantis MG, Kuzmenko YV, Latanova AA, Krotova OA, Karpov VL. Fusion to the Lysosome Targeting Signal of the Invariant Chain Alters the Processing and Enhances the Immunogenicity of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Acta Naturae*—2014. V. —6. № — 1. — p. 61-68.
5. Petkov SP, Heuts F, Krotova OA, Kilpeläinen A, Engström G, Starodubova ES, Isaguliantis MG. Evaluation of immunogen delivery by DNA immunization using non-invasive bioluminescence imaging. *Hum Vaccin Immunother.* —2013. V. —9. № — 10. —p. 2228-2236.
6. Isaguliantis M, Smirnova O, Ivanov AV, Kilpeläinen A, Kuzmenko Y, Petkov S, Latanova A, Krotova O, Engström G, Karpov V, Kochetkov S, Wahren B, Starodubova E. Oxidative stress induced by HIV-1 reverse transcriptase modulates the enzyme's performance in gene immunization. *Hum Vaccin Immunother.* —2013. V. —9. № — 10. —p. 2111-2119.
7. Gordeychuk I.V., Abakumov M.A, Gulyaev S.A., Tukhvatulina N.M., Gulyaeva T.V., Logunov D.Y., Isaguliantis M.G. Marmoset model, immune characteristics. International conference "Perspective technologies in vaccination and immunotherapy" October 5-8, 2018, Moscow, Russia; Future Biomedicine Conference Series Moscow MDM Print, October 2018, ISSN 2619-1121 —2018. —№2, —p. 21.

CONSENSUS MULTIGEN DNA VACCINES, UNIVERSAL INSTRUMENT FOR DESIGN OF FUTURE MICROBIAL VACCINES

Gordeychuk I.V.^{1,2,3}, Jansons J.^{4,5}, Skrastina D.⁵, Latanova A.A.^{3,6}, Starodubova E.S.⁶, Petkov S.^{6,7}, Isaguliantis M.G.^{1,3,4}

¹Chumakov Center for Research and Development of Immune and Biological Preparations, Moscow;

²IM Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow;

³NF Gamaleya National Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow;

⁴Riga Stradins University, Riga;

⁵Biomedical Research and Study Center, Riga;

⁶Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow;

⁷Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm

e-mail: maria.issagouliantis@rsu.lv

DNA is a rapidly developing platform for generating novel vaccines against infectious and non-infectious diseases. Progress of research aiming at optimization of DNA vaccines design, delivery, and immunogenic performance led to marked increase in their efficacy in large species and man. This presentation will review the principles used in creating DNA vaccines against microbial infections and related forms of cancer, progress in their development, and experience in experimental DNA vaccines applications. Overview will be given of the methods used in the design of DNA immunogens, their delivery, the expression of single and multiple genes, and approaches to screen the immune response, and also to prognose it by *in vitro* tests and by non-interfering *in vivo* applications based on bioluminescence imagining technique.

Key words: DNA vaccine, consensus gene, delivery, electroporation, expression, immune response

DNA immunogens are represented by plasmids, or mini-plasmids/mini-circles which encode proteins to be expressed in the body of vaccine, to induce an immune response. The quality and magnitude of the response depend on the nature of DNA immunogen, and for multi-gene vaccines, on their composition, site, route and/or method used for delivery, delivery vehicles and eventual adjuvants. DNAs are mainly synthetic, ensuring enhanced expression. Modern ones do not rely on the microbial genes but encode pre-tailored immunogens which offers a

number of strong benefits. Firstly, design of such synthetic immunogens requests only information on sequence of microbial agent, readily accessible for modern microbiology. Secondly, it allows to delete harmful elements, and add elements potentiating immune response. Thirdly, for vaccines against highly variable pathogens, it allows to design consensus immunogens that represent the conserved features of microbial antigens, with immunodominant epitopes crucial for induction of efficient antimicrobial immune response.

DNA vaccine immunogenicity is shaped by the routes by which the encoded antigen are processed and presented [1,2]. These processes can be easily manipulated. Routinely, an antigen synthesized within the host cell is processed by proteasome, loaded onto, and presented in complex with MHC I molecules. However, it can be re-routed to lysosome, or secreted to be further presented in complex with MHC II. We have tested both approaches using a panel of processing signals. The best were signals from Lysosome Associated Membrane Protein I ensuring MHC class II presentation, fusion to which induced a balanced Th1/Th2 type of immune response; flaviviral leader peptide was less effective [3,4].

Immunogenicity strongly depends on the method used for DNA delivery and delivery site tissues and cells are the first to express the immunogen and the level of expression. DNA vaccines can be delivered intramuscularly, subcutaneously, intradermally, or by invasive or non-invasive mucosal applications. An intense debate on the pros and cons of different routes of delivery is ongoing. A number of studies have studied the dependence of the immune response induced by single and multiple gene immunizations on the delivery methods. According to some, delivery route determines the immunogenic performance, according to others, it determines the level of the response, but not its specificity or Th-polarity. Our data supports the latter [2]. Recent boom in DNA vaccine applications has been associated with electroporation which allows a 1000-fold enhancement of the efficacy of *in vivo* DNA delivery, and offers adjuvant effect due to local inflammation. We have optimized the process of electroporation of single DNA immunogens and their mixtures into rodents with successful induction of specific immune response [1]. We demonstrated little competition of consensus DNA immunogens when delivered as mixtures. The latter simplifies R&D of multi-target microbial vaccines.

Cellular responses induced by DNA vaccines are often more pronounced, and mimic the events occurring in microbial, especially viral, infections. Immune responses can be assessed by multiple immune methods, including single, and double cytokine Fluorospot, multiparametric FACS, ELISA or Luminex assays assessing secreted cytokines, and antibody ELISA. We have also developed minimally invasive *in vivo* surrogate assay for assessment of integral immune response in small live animals [1, 5]. Namely, DNA immunogen as administered as a mixture with plasmid encoding enzyme luciferase. Presence of cells expressing luciferase is assessed by *in vivo* bioluminescent imaging. Immune response against DNA immunogen kills cells dually expressing immunogen and luciferase, as registered by the loss of *in vivo* bioluminescence from the sites of immunization. Method can be used to detect an immune response against DNA immunogen even when its epitopes are not known. In addition, we developed an approach to predict immunogenicity of plasmid DNA by assessing its capacity to induce stress and oxidative stress response in transfected cells *in vitro* [6] and Jansons J et al, Cells 2018 submitted. Both methods allow to monitor the response without sacrificing animals, and are efficient for assessment of multi-gene DNA vaccines with minimal animal use in lines with 3R-principles of animal research. We have applied these approaches in the development of the candidate multi-gene DNA vaccine against drug resistance in HIV infection, and hepatitis C associated liver cancer, and in their testing in the mouse models. This approach was lately shown to work also in non-human primate model [7].

Acknowledgements: Russian Science Fund №15-15-30039; Russian Fund for Basic Research №17_04_00583; EU Twinning grant VACTRAIN contract №692293, and project LZP-20182-0308.

References:

1. Petkov S, Starodubova E, Latanova A, Kilpeläinen A, Latyshev O, Svirskis S, Wahren B, Chiodi F, Gordeychuk I, Isaguliant M. DNA immunization site determines the level of gene expression and the magnitude, but not the type of the induced immune response. *PLoS One* —2018. V. —13. № — 6. —e0197902.
2. Latanova AA, Petkov S, Kilpeläinen A, Jansons J, Latyshev OE, Kuzmenko YV, Hinkula J, Abakumov MA, Valuev-Elliston VT, Gomelsky M, Karpov VL, Chiodi F, Wahren B, Logunov DY, Starodubova ES, Isaguliant MG. Codon optimization and improved delivery/immunization regimen enhance the immune response against wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase, preserving its Th2-polarity. *Sci Rep.* —2018. V. —8. № — 1. —doi: 10.1038/s41598-018-26281-z.
3. Latanova A, Petkov S, Kuzmenko Y, Kilpeläinen A, Ivanov A, Smirnova O, Krotova O, Korolev S, Hinkula J, Karpov V, Isaguliant M, Starodubova E. Fusion to Flaviviral Leader Peptide Targets HIV-1 Reverse Transcriptase for Secretion and Reduces Its Enzymatic Activity and Ability to Induce Oxidative Stress but Has No Major Effects on Its Immunogenic Performance in DNA-Immunized Mice. *J Immunol Res.* —2017. V. —2017:7407136.
4. Starodubova ES, Isaguliant MG, Kuzmenko YV, Latanova AA, Krotova OA, Karpov VL. Fusion to the Lysosome Targeting Signal of the Invariant Chain Alters the Processing and Enhances the Immunogenicity of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Acta Naturae*—2014. V. —6. № — 1. — p. 61-68.

5. Petkov SP, Heuts F, Krotova OA, Kilpelainen A, Engström G, Starodubova ES, Isagulians MG. Evaluation of immunogen delivery by DNA immunization using non-invasive bioluminescence imaging. *Hum Vaccin Immunother.* —2013. V. —9. № —10. —p. 2228-2236.
6. Isagulians M, Smirnova O, Ivanov AV, Kilpelainen A, Kuzmenko Y, Petkov S, Latanova A, Krotova O, Engström G, Karpov V, Kochetkov S, Wahren B, Starodubova E. Oxidative stress induced by HIV-1 reverse transcriptase modulates the enzyme's performance in gene immunization. *Hum Vaccin Immunother.* —2013. V. —9. № —10. —p. 2111-2119.
7. Gordeychuk I.V., Abakumov M.A., Gulyaev S.A., Tikhvatulina N.M., Gulyaeva T.V., Logunov D.Y., Isagulians M.G. Marmoset model, immune characteristics. International conference "Perspective technologies in vaccination and immunotherapy" October 5-8, 2018, Moscow, Russia; Future Biomedicine Conference Series Moscow MDM Print, October 2018, ISSN 2619-1121 —2018. —№2, —p. 21.

МУКОЗАЛЬНАЯ ВАКЦИНА СО ВСТРОЕННЫМ АДЬЮВАНТОМ ПРОТИВ ДИСБИОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

Сао Пут, Сеол Хи Хонг, Ши Юн Ли, Джун Хэн Ри

Центр исследований и разработок клинических вакцин, Национальный университет Чоннам, Республика Корея

Пародонтоз связан с дисбиотическими изменениями в микробиоме полости рта. Фундаментальной терапевтической стратегией против пародонтоза могли бы стать варианты вакцинации, предотвращающие болезнетворные сдвиги в микробиоме биопленки полости рта. Образование зубного налета – процесс, протекающий во многих слоях и вовлекающий с себя множество микробов, в силу этого вакцины, ориентированные на отдельные виды болезнетворных бактерий будут иметь только ограниченное клиническое применение.

Ключевые слова: мукозальная вакцина, пародонтоз

В представленном исследовании нами была разработана бивалентная мукозальная вакцина, нацеленная против ключевых факторов вирулентности провоспалительных бактерий *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis* и состоящая из смеси слитых белков на основе их факторов патогенности и флагеллина (FlaB), FlaB-tFomA и Hgp44-FlaB, соответственно. Был введен новый тип линкеров между FlaB и антигенным доменом слитых белков, что позволило повысить стабильность и иммуногенность вакцинных антигенов. Интраназальная вакцинация бивалентной вакциной вызвала протективный иммунный ответ, предотвращающий потерю альвеолярной костной массы, вызываемую инфекцией *F. nucleatum* и *P. gingivalis*. Слияние протективных антигенов провоспалительных бактерий с флагеллином усилило антиген-специфический иммунный ответ и рекомбинацию на этапе переключения классов иммуноглобулинов. Антитела, выработанные в ответ на бивалентную вакцину, распознавали нативные формы поверхностных антигенов бактерий и реагировали с различными клиническими изолятами субтипов *Fusobacterium* и *P. gingivalis*. Сыворотки ингибировали образование *F. nucleatum* биопленок, со-агрегацию *P. gingivalis* и *Treponema denticola* и взаимодействие *P. gingivalis* с клетками хозяина. В целом, мукозальная вакцина на основе протективных антигенов бактерий, слитых с флагеллином, показала эффективность такого подхода к вакцинации как технологической платформы для создания мультивалентных вакцин против пародонтоза, направленных против дисбиотического микробиома.

A BUILT-IN ADJUVANT-ENGINEERED MUCOSAL VACCINE AGAINST DYSBIOTIC PERIODONTAL DISEASES

Sao Puth, Seol Hee Hong, Shee Eun Lee, Joon Haeng Rhee

Clinical Vaccine R&D Center, Chonnam National University, Republic of Korea

Periodontitis is associated with a dysbiotic shift in the oral microbiome. Vaccine approaches to prevent microbial shifts from healthy to diseased state in oral biofilms would provide a fundamental therapeutic strategy against periodontitis. Since dental plaque formation is a polymicrobial and multilayered process, vaccines targeting single bacterial species would have limited efficacy in clinical applications.

Key words: mucosal vaccine, periodontitis

In this study, we developed a divalent mucosal vaccine consisting of a mixture of FlaB-tFomA and Hgp44-FlaB fusion proteins targeting key virulence factors of inflammophilic bacteria *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*, respectively. Introduction of novel linkers between FlaB and antigen domain improved the stability and immunogenicity of engineered vaccine antigens. The intranasal immunization of divalent vaccine induced protective immune responses inhibiting alveolar bone loss elicited by *F. nucleatum* and *P. gingivalis* infection. The built-in flagellin adjuvant fused to protective antigens enhanced antigen-specific antibody responses and class switch recombination. The divalent vaccine antisera recognized natural forms of surface antigens and reacted with diverse clinical isolates of *Fusobacterium* subspecies and *P. gingivalis*. The antisera inhibited *F. nucleatum*-mediated biofilm formation, co-aggregation of *P. gingivalis* and *Treponema denticola*, and *P. gingivalis*-host cell interactions. Taken together, the built-in adjuvant-engineered mucosal vaccine provides a technological platform for multivalent periodontitis vaccines targeting the dysbiotic microbiome.

УДК 615.371

НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ

Ю.М. Васильев

Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Российская Федерация 197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7
e-mail: y.m.vasiliev@hpb.spb.ru

Рассмотрены перспективы и ограничения основных направлений исследований и разработок вакцин против гриппа следующего поколения. До создания принципиально новых вакцин особый интерес представляют иммуноадъюванты.

Ключевые слова: вакцины против гриппа; иммуноадъюванты; универсальные вакцины

Актуальность гриппа как инфекционного заболевания не вызывает сомнения. Основа борьбы с гриппом, а также подготовки к пандемии - своевременная вакцинопрофилактика, однако имеющиеся вакцины обладают неоптимальным сочетанием эффективности, безопасности, а также экономической целесообразности, особенно при массовом применении. Более того, основная масса применяемых в настоящее время вакцин против гриппа - инактивированные расщепленные или субъединичные, относящиеся ко II и III поколению, соответственно, не лишены ряда ограничений, в первую очередь - низкая перекрестная иммуногенность, а также недостаточная эффективность в группах риска.

Виросомальные вакцины (воссозданные вирусные частицы с включением необходимых антигенов) являлись основными кандидатами следующего поколения, однако полевые испытания выявили существенные риски в части безопасности.

Альтернативой инактивированным вакцинам, вводимым внутримышечно (подкожно), являются живые аттенуированные (прежде всего холодадаптированные, вводимые интраназально). Несмотря на индукцию иммунитета практически аналогичную естественной инфекции и удобный способ применения, эти вакцины пока не получили такого же широкого распространения как инактивированные. Более того, несколько сезонов они не были рекомендованы к применению в некоторых странах. Тем не менее, продолжается создание штаммов-доноров аттенуации на основе других подходов.

Исследования и разработки вакцин-кандидатов против гриппа следующего поколения в последние годы сконцентрированы в ряде направлений. Во-первых, это использование альтернативных субстратов и платформ для получения антигена (культуральные и рекомбинантные вакцины), однако остаются сложности с иммуногенностью. Во-вторых, это векторные вакцины - на основе живых вирусов, также экспрессирующие антигены гриппа, однако остаются вопросы по интерференции иммунитета к вирусу-вектору. В-третьих, это ДНК-вакцины, в отношении которых требует изучения оптимальный способ введения и контроль дозировки.

Особое внимание следует уделить универсальным вакцинам против гриппа. Хотя получить один иммунобиопрепарат, способный защитить от любого вируса гриппа невозможно, имеющиеся данные позволяют говорить о подходах существенного повышения перекрестного иммунитета.

Иммуноадъюванты (адъюванты) для включения в состав вакцины и системы доставки позволяют не только снять ограничения имеющихся вакцин, но и создать на их основе современные иммунобиопрепараты, а также дать «вторую жизнь» классическим вакцинам.

В последние годы проблемы профилактики гриппа с помощью вакцин определяются не только собственными ограничениями этих иммунобиопрепаратов, но также связаны с системными факторами, в частности недостаточной мощностью производства и антивакцинальной риторикой в широких слоях общества.

Таким образом, для создания вакцин против гриппа следующего поколения нужны, прежде всего, принципиально новые направления исследований и разработки, объективная научная оценка имеющихся кандидатов, а также развитие производственной базы текущего поколения и оригинальных отечественных вакцин против гриппа.

UDC 615.371

NEXT GENERATION INFLUENZA VACCINES: CHALLENGES AND PERSPECTIVES

Y.M. Vasiliev

*State Research Institute of Ultrapure Biologicals, St. Petersburg, Russian Federation
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya, 7
e-mail: y.m.vasiliev@hpb.spb.ru*

Perspectives and limitations for R&D of next generation influenza vaccines are overviewed. Adjuvants are the most promising approach until novel vaccines are developed.

Key words: influenza vaccines; adjuvants; universal vaccines

Influenza is the global healthcare challenge. Timely vaccination is the cornerstone of influenza control and pandemic preparedness, however, available vaccines are suboptimal in effectiveness, safety, as well as economic feasibility, especially during mass administration. Moreover, inactivated split and subunit vaccines (generation II and III, respectively) are currently the most used, but also possess limitations - low cross-immunity and insufficient effectiveness in risk groups.

Virosomal vaccines (recreated virus particles with the necessary antigens included) were the principal candidates for next generation vaccines, however, field trials have revealed significant safety risks.

Live attenuated (first of all - cold-adapted intranasally administered) vaccines are the alternative to inactivated vaccines intramuscularly (subcutaneously) administered. Though the induced immunity is almost analogous to natural infection and administration route is simple, these vaccines are not as widespread as inactivated vaccines. Moreover, these vaccines were not recommended for several seasons in some countries. Nevertheless, development of strain-donors based on other approaches goes on.

R&D for next generation influenza vaccines is concentrated in several fields. First of all, alternative substrates and platforms for antigen generation are studied (cultural and recombinant vaccines), however, there are issues with immunogenicity. Secondly, vector vaccines - based on live viruses expressing influenza antigens are studied, however, interfering immunity against the vector needs to be elucidated. Thirdly, DNA vaccines are considered, but optimal delivery route and dosing require further studies.

Universal influenza vaccines are a promising approach. Though no single vaccine can protect against every influenza virus strain, available data suggest that cross-immunity can be increased significantly.

Vaccine adjuvants (immune adjuvants) and delivery systems can not only remove limitations of the currently available vaccines, but also be used to develop modern vaccines, as well as rejuvenate classic vaccines.

Challenges with influenza vaccination have recently become multi-disciplinary and include limited manufacturing capacities and anti-vaccination movements.

Thus, revolutionary approaches to R&D are urgently needed for next generation influenza vaccines; as well as scientific evaluation of the available candidates and development of manufacturing base of the current generation and original Russian influenza vaccines.

УДК 34.43.17: 615.37

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В-ТИПА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОПИАТНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Трофимов А.В.¹, Гамалея Н.Б.², Ульянова Л.И.², Рак А.Я.¹, Берзина А.Г.², Горбунов Н.П.¹, Родин С.В.¹, Ищенко А.М.¹

¹Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия 197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П.Сербского» Минздрава России, Москва, Россия. 119034, Москва, Кропоткинский пер., д. 23
e-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

Получены антиидиотипические антитела типа $\beta 2$, несущие антигенные детерминанты морфина и стимулирующие продукцию морфин-связывающих антител у кроликов.

Ключевые слова: вакцина, морфин, антиидиотипические антитела, гибридома, налоксон

Введение. Иммунопрофилактика наркоманий или вакцинация от наркотической зависимости – это перспективное направление в наркологии, имеющее важное практическое значение, так как профилактика возможной наркотизации (первичная) или предупреждение дальнейших рецидивов (вторичная) является самым эффективным способом лечения наркотической зависимости.

Цель. Целью данного исследования было получение и характеристика антиидиотипических моноклональных антител (АИ), морфиноподобные свойства которых позволят использовать их в качестве вакцины.

Методы. Для получения антиидиотипических моноклональных антител (АИ) в качестве антигенов использовали полученные ранее моноклональные антитела (мАт) 3К11 и 6Г1, распознающие разные участки молекулы морфина [1]. Мышей линии Balb/c иммунизировали конъюгатами этих антител с гемоцианином в полном адъюванте Фрейнда (ПАФ) в дозе 10 мкг на мыш. На 30-й день после иммунизации животным вводили внутривенно 5 мкг мАт 3К11 или 6Г1 в физиологическом растворе. На 4-й день после инъекции, после умерщвления животных, выделяли спленоциты и лимфоциты паховых и брюшных лимфоузлов. Полученные клетки смешивали с клетками миеломы мыши линии SP 2/0 в соотношении 2:1. Гибридизацию клеток по методу Мильштейна-Кёлера проводили в соответствии с ранее описанной методикой.

Антитела из асцитных жидкостей выделяли методом аффинной хроматографии с использованием приготовленных иммуносорбентов 3К11–сефароза или 6Г1–сефароза. Для определения антиидиотипической специфичности моноклональных антител проводили конкурентный иммуноферментный анализ с использованием АИ и конъюгатов мАт 3К11 и 6Г1 с пероксидазой хрена.

Результаты. получены 3 клон – продуцента АИ, два из которых, АИ-К11А и АИ-К11В, по данным конкурентного ИФА продуцировали антитела, специфичные к мАт-3К11, и один клон АИ-Г1 служил продуцентом АИ, распознающих мАт-6Г1.

Биологическую активность полученных АИ в сравнении с морфином оценивали на перевиваемой клеточной линии глиобластомы человека Т98Г, клетки которой несут на своей поверхности опиоидные κ - и μ -рецепторы. Показано, что антитела АИ-К11В, АИ-Г1, используемые в диапазоне концентраций от 0,39 до 10 мкг/мл, как и морфин, стимулировали усиление синтеза ДНК, которое ингибировалось антагонистом опиоидных рецепторов налоксоном. Иммунизация полученными АИ кроликов индуцировала продукцию антител, которые обладали способностью связываться с морфином, что свидетельствовало об их принадлежности к $\beta 2$ -типу АИ.

Закключение. Полученные результаты свидетельствуют о морфин подобных свойствах полученных АИ и возможности их использования в качестве вакцинного антигена, поскольку ранее было показано, что поликлональные АИ к тем же первоначальным производным морфина оказывают терапевтическое и профилактическое действие на модели морфин-зависимых крыс [2].

Литература:

1. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Кротов Г.И., Ульянова Л.И. Получение поликлональных и моноклональных антител к двум производным морфина // Вопросы наркологии. – 2016. –

№11-12. – С. 39-54.

2. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В. Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов // Патент России №2548802.2013

UDC 34.43.17 : 615.37

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES OF B-TYPE TO USE AS POTENTIAL VACCINE AGAINST OPIOID ADDICTION

Trofimov A.V.¹, Gamaleya N.B.², Ulyanova L.I.², Rak A.Ya.¹, Berzina A.G.², Gorbunov N.P.¹, Rodin S.V.¹, Ischenko A.M.¹

¹State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia.

197110 St. Petersburg, Pudozhskaya street, 7

²Serbsky State Research Center for Social and Forensic Psychiatry, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

119034, Moscow, Kropotkinskiy per., 23

e-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

The anti-idiotypic antibodies of $\beta 2$ -type that carried morphine antigenic determinants were produced and were shown to stimulate the production of morphine-binding antibodies in rabbits

Key words: vaccine, morphine, anti-idiotypic antibodies, hybridoma, naloxone

Background. Immunoprophylaxis and vaccination against drug abuse is a promising area of narcology as prevention of possible narcotization (primary) or of further relapse (secondary) are of great practical importance as the most effective method for treating drug abuse.

Aim. The objective of this study was to generate and to characterize monoclonal anti-idiotypic (AI) antibodies which may serve as a potential vaccine due to their morphine-like properties.

Methods. To generate monoclonal anti-idiotypic antibodies, 3K11 and 6G1 MAbs produced earlier were used as antigens. These MAbs were able to recognize different sites on morphine molecule [1]. Balb/c mice were immunized with conjugates of these MAbs with hemocyanine in Freund's complete adjuvant at a dose of 10 μ g/mouse. On day 30 post-immunization, mice were injected i/v with 5 μ g of 3K11 or of 6G1 MAb in physiological saline. On day 4 after injection, spleen cells and lymphocytes were isolated from inguinal and retroperitoneal lymph nodes of killed mice. The cells were mixed with SP 2/0 mouse myeloma cells at a ratio of 2:1, and cell hybridization was performed by Milstein and Köhler in accordance with the protocol described earlier.

To purify AI antibodies from ascitic fluids, affinity chromatography with 3K11-Sepharose and 6G1-Sepharose immunoadsorbents was used. The anti-idiotypic activity of antibodies was examined by competitive enzyme-linked immunosorbent assay with the use of both AI antibodies and the 3K11 and 6G1 MAbs conjugates with horseradish peroxidase.

Results. Three antibody clones producing anti-idiotypic antibodies (AI) were generated. By data of competitive enzyme-linked immunosorbent assay, two of the clones (AI-K11A and AI-K11B) generated antibodies specific to MAb 3K11 and one (AI-G1) generated anti-idiotypic antibodies that recognized 6G1 MAb.

Biological activity of the antibodies in comparison with that of morphine was examined with continuous human glioblastoma T98G cell line bearing opioid κ - and μ -receptors on cell surface. The AI-K11B and AI-G1 antibodies, similar to morphine, were demonstrated to cause an increase of DNA synthesis, being used at the concentrations 0.39 to 10 μ g/ml. This increase was inhibited by the antagonist of opioid receptors naloxone.

Immunization of rabbits with the AI antibodies produced was shown to induce the production of antibodies which were able to bind morphine. This suggested the antibodies to be of $\beta 2$ type AI.

Conclusions. The results indicate the morphine-like properties of the anti-idiotypic antibodies and the possibility of their use as a vaccine antigen, as polyclonal AI against the same primary morphine derivatives were previously shown to produce both therapeutic and prophylactic effects in a model of morphine dependent rats [2].

References:

1. Berzina A.G., Gamaleya N.B., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Krotov G.I., Ulyanova L.I. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against two morphine derivatives // *Voprosy narkologii*. 2016. No.11-12. S.39-54.

2. Gamaleya N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Fokin Yu.V. An Immunogen for Therapy and Prophylaxis of Opioid Addiction // Russian Patent №2548802.2013

УДК 615.281.8

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ БОЛЬШИХ ОБЪЕМОВ ОБЩЕДОСТУПНЫХ ДАННЫХ

Осолодкин Д.И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Россия, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, строение 1
108819, Россия, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, стр. 1
e-mail: dmitry_o@qsar.chem.msu.ru

Ключевые слова: вирусные заболевания, противовирусные лекарственные средства

Вирусные инфекции представляют серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире. Регулярно возникают резистентные варианты хорошо изученных вирусов, таких как ВИЧ или вирус гепатита С, и вспышки менее изученных вирусов, таких как вирус Зика или вирус Эбола. Тем не менее, только для девяти вирусных заболеваний из по крайней мере двухсот существуют способы специфичной лекарственной терапии, что оставляет широкое поле для разработки лекарств. Создание новых противовирусных препаратов на основе больших объемов данных — это многообещающий подход, основанный на уже имеющейся информации о противовирусной активности малых молекул.

Публичные базы данных, накапливающие информацию из разных источников, таких как ChEMBL или PubChem, часто содержат не совсем корректные описания биологической активности. Мы разработали полуавтоматический подход для однозначной привязки описаний экспериментов, доступных в ChEMBL, к вирусным таксонам Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV). Полученный набор данных ViralChEMBL содержит в три раза больше соединений и записей о противовирусной активности, чем можно извлечь с помощью дерева таксономии в веб-интерфейсе ChEMBL. Обсуждается текущее состояние этого набора данных и перспективы его дальнейшего развития.

Расширенная таксономическая аннотация ViralChEMBL позволяет создавать профили противовирусной активности для малых молекул, которые можно использовать для моделирования методами машинного обучения и исследований по перепозиционированию лекарств. Показаны примеры успешного прогнозирования противовирусной активности различными методами и результаты экспериментальной валидации и прогноза.

UDC 615.281.8

ANTIVIRAL ACTIVITY PREDICTION FOR SMALL MOLECULES BASED ON BIG PUBLIC DATA

Osolodkin D.I.

Federal State Budgetary Scientific Institution Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences
108819, Russian Federation, Moscow, premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement "Moskovskiy"
e-mail: dmitry_o@qsar.chem.msu.ru

Key words: viral diseases, antiviral drugs

Viral infections represent a serious public health threat all over the world. Resistant variants of well-studied viruses, such as HIV or hepatitis C virus, appear regularly, and outbreaks of less studied viruses, such as Zika or Ebola viruses, are not uncommon. Nevertheless, only nine viral diseases of at least two hundred known may be specifically treated with small molecules, leaving a bold opportunity for antiviral drug design. Big data driven design of new antivirals is a promising approach grounded on already available information on antiviral activity of small molecules.

Public databases accumulating the antiviral activity information from different sources, such as ChEMBL or PubChem, often suffer from insufficient curation of biological assay description. We have developed a semi-automatic approach to unambiguously map the ChEMBL assay descriptions to viral taxa according to the International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV). The resulting dataset ViralChEMBL contains three times

more compounds and antiviral activity records than could be extracted via taxonomy tree at the ChEMBL web interface. Current state of the dataset in its further development will be discussed.

Enhanced taxonomy annotations allow the creation of antiviral activity profiles for small molecules that may be used to train machine learning models and to repurpose small molecule drugs to the antiviral indications. Several examples of successful prediction of antiviral activity with different methods and experimental validation of the predictions will be shown.

РАЗРАБОТКА И КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ

Козлов А.П., Аль-Шехадат Р.И., Акулова Е.Б., Мурашев Б.В., Веревошкин С.В., Машарский А.Э., Поддубный В.А., Востокова Н.В., Лioznov Д.А.

Биомедицинский центр и Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА РФ

Со времени выделения СПИДа как самостоятельного заболевания в 1981 г. в мире, по оценкам ВОЗ, официально зарегистрировано около 60 миллионов ВИЧ-инфицированных человек, из них около 30 миллионов умерло от СПИДа. Несмотря на огромные усилия мирового сообщества, пандемию ВИЧ-инфекции остановить не удастся. Одним из направлений исследований в данной области является разработка вакцин против ВИЧ/СПИД.

Ключевые слова: СПИД, вакцина, ВИЧ

Биомедицинским центром совместно с ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России разработана ДНК-вакцина «ДНК-4», которая представляет собой смесь четырех плазмидных ДНК в изотоническом растворе хлорида натрия, 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 было установлено, что вакцина безопасна и хорошо переносится в дозах 0,25 мг, 0,5 мг и 1,0 мг на вакцинацию. Иммунизация «ДНК-4» вызывала ВИЧ-специфические Т-клеточные иммунные ответы у 100% вакцинированных индивидуумов. На сегодняшний день завершился II этап клинических испытаний «ДНК-4». Это было многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование II фазы. Были определены безопасность, иммуногенность и анализ дозы для людей, инфицированных ВИЧ-1, на ВААРТ. «ДНК-4» безопасна и хорошо переносится ВИЧ-инфицированными при ВААРТ в дозах 0,25 мг и 0,5 мг. У нескольких вакцинированных пациентов (2 пациента из группы 0,25 мг и 1 пациент из группы 0,5 мг) были обнаружены данные, указывающие на возможную латентную активацию вирусных резервуаров. Это может быть вызвано индукцией клеточного иммунитета (активация CD8 + Т-клеток после иммунизации ДНК-вакциной) и экспрессией TNFα у вакцинированных пациентов, как показано в предыдущих исследованиях.

Кандидатная ДНК-вакцина «ДНК-4» является безопасной и иммуногенной для здоровых людей и ВИЧ-инфицированных пациентов на ВААРТ. Эта гипотеза активации латентных вирусных резервуаров в ответ на вакцинацию требует дальнейшего изучения и анализа всех имеющихся данных и клинических образцов. В настоящее время мы работаем над рекомбинантным бустером белка р17 ВИЧ для терапевтической ДНК-вакцины.

DEVELOPMENT AND CLINICAL TRIALS OF HIV DNA VACCINE

Kozlov A.P., Al-Shekhadat R.I., Akulova E.B., Murashev B.V., Verevoshkin S.V., Masharsky A.E., Poddubnyy V.A., Vostokova N.V., Lioznov D.A.

The Biomedical Center and State Research Institute of Highly Pure Biopreparations

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 cannot be stopped. The development of vaccines against HIV/AIDS is one of the impotent steps in this field.

Key words: AIDS, vaccines, HIV

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 found to be safe and well tolerated at doses 0.25 mg, 0.5 mg, and 1.0 mg per vaccination. Immunization with "DNA-4" induced HIV-specific T cell immune responses in 100% vaccinated individuals.

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.

"DNA-4" was safe and well tolerated for HIV infected people on HAART at doses 0.25 mg and 0.5 mg.

In several vaccinated patients (2 patients from 0.25 mg group and 1 patient from 0.5 mg group) data indicating the possible latent viral reservoirs activation were found. This might be caused by the induction of cell immunity (CD8+ T cell activation after immunization with DNA vaccine), and expression of TNF α in vaccinated patients as shown by previous studies.

Candidate DNA vaccine "DNA-4" is safe and immunogenic in healthy individuals and HIV-infected patients on HAART. This hypothesis of latent viral reservoirs activation in response to vaccination requires further investigation and analysis all available data and clinical samples. Currently, we are working on recombinant HIV p17 protein booster for therapeutic DNA vaccine.

УДК 578.74; 615.371

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ФЛАВИВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Карганова Г.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Россия, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, строение 1
108819, Россия, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, стр. 1
e-mail: karganova_gg@chumakovs.su

Представители рода Flavivirus представляют в проблему для здравоохранения во всем мире, потому что являются возбудителями многих тяжелых заболеваний человека и животных, в том числе лихорадки денге, желтой лихорадки, лихорадки Западного Нила, клещевого энцефалита, японского энцефалита, Зика, Повассан и т.д.

Ключевые слова: вакцины, флавивирусы

Пристальное внимание к вирусам данной группы обусловлено следующими причинами: отмеченное в последнее время резкое и значительное повышение заболеваемости, в том числе, появление городских очагов, переносимых комарами флавивирусных инфекций; способность к быстрому распространению на новой территории, расширение границ распространения; изменение вирулентного потенциала, когда на фоне резкого увеличения числа лихорадочных заболеваний начинают регистрироваться случаи тяжелого течения с не описанными ранее клиническими симптомами и высокой летальностью; способность к изменению способов распространения; длительный период восстановления и достаточно высокий уровень инвалидизации после перенесенного острого заболевания; возможность хронических форм.

Особое опасение в связи с флавивирусными инфекциями вызывает возможность, так называемого, антитело-зависимого повышения инфекции (АЗПИ). Впервые АЗПИ было описано для 4 серотипов вируса денге, которые значительно отличаются друг от друга, хотя и имеют выраженные антигенные перекресты. В настоящее время, когда значительно расширились территории, где циркулирует несколько флавивирусов, показана возможность АЗПИ и при суперинфекции разными флавивирусами.

На территории РФ циркулируют, как минимум, 5 известных флавивирусов: вирус клещевого энцефалита (ВКЭ, 3 субтипа и две отдельные филогенетические группы), вирус Западного Нила, вирус омской геморрагической лихорадки (2 субтипа), вирус японского энцефалита и вирус Повассан. Обсуждается вопрос о появлении вируса Денге в Крыму и в Краснодарском крае. Нами обнаружены новые флавивирусы, патогенный потенциал которых еще не изучен. Ежегодно регистрируется более 100 случаев заболеваний, вызванных флавивирусом, не характерными для России, среди жителей РФ, выезжающих за границу, и их число неуклонно растет. Расширяются территории смешанных флавивирусных очагов.

Для создания флавивирусных вакцин в настоящее время используют: разные подходы для создания препаратов на основе не содержащих геном вирус-подобных частиц; аттенуированные живые вирусы, которые представляют собой химеры двух флавивирусов с внесенными аттенуирующими мутациями; дефектные по репродукции вирусы, которые способны только на один цикл репродукции в клетках; вирусы, неспособные к репродукции в ЦНС и членистоногих за счет внесения сайтов для микроРНК.

Таким образом, в последнее время число флавивирусных инфекций, требующих профилактики, возрастает, группы риска, требующих профилактики, также резко расширяются за счет формирования городских очагов, число смешанных очагов увеличивается, а в связи с этим и опасность АЗПВ. Все это и высокая стоимость вакцинопрофилактики требует новых подходов к созданию вакцинных препаратов, которые будут основаны на хорошем знании биологии флавивирусов, закономерностях формирования поствакцинального и инфекционного иммунного ответа и использовании современных технологических разработок. Такими подходами может быть: создание комплексных вакцин, обеспечивающих защиту сразу от нескольких флавивирусов; оценка возможности использования вакцин на основе одного флавивируса как суррогатной для защиты от других флавивирусов (вакцина защищает от тяжелого течения заболевания и осложнений); разработка универсальной технологии приготовления вакцинных препаратов и банка хорошо охарактеризованных посевных вирусов для возможности быстрого перехода на получение новой вакцины.

UDC 578.74; 615.371

MODERN APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF FLAVIVIRUS VACCINES

Karganova G.G.

*Federal State Budgetary Scientific Institution Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences
108819, Russian Federation, Moscow, premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement "Moskovskiy"
e-mail: karganova_gg@chumakovs.su*

Representatives of the genus *Flavivirus* represent a problem for public health worldwide, being the causative agents of many serious diseases of humans and animals, including dengue fever, yellow fever, West Nile fever, tick-borne encephalitis, Japanese encephalitis, Zika, Powassan, etc.

Key words: vaccines, flaviviruses

Attention to the viruses of this group is due to the following reasons: the recent sharp increase in the incidence rate, including the appearance of urban foci with flavivirus infections transmitted by mosquitoes; the ability to spread rapidly in the new territory, expanding the boundaries of epidemics; a change in virulence potential, when a sharp increase in the number of febrile diseases is coupled with severe cases with no previously described clinical symptoms and high mortality; ability to change the routes of distribution; a long recovery period and a fairly high level of disability after acute illness; possibility of chronic forms.

Of particular concern with flavivirus infections is the possibility of the so-called antibody-dependent enhancement of infection (ADE). Primarily ADE had been described for 4 serotypes of dengue virus, which differ significantly from each other, while being highly similar antigenically. Nowadays, when the territories with circulation of several flaviviruses have expanded significantly, the possibility of ADE has been shown in cases of co-infection with different flaviviruses.

At least 5 known flaviviruses circulate in the Russian Federation: tick-borne encephalitis virus (TBEV, 3 subtypes and two separate phylogenetic groups), West Nile virus, Omsk hemorrhagic fever virus (2 subtypes), Japanese encephalitis virus and Powassan virus. The question of the emergence of the Dengue virus in the Crimea and the Krasnodar Territory is being discussed. We have discovered new flaviviruses, the pathogenic potential of which has not yet been studied. More than 100 cases of diseases caused by flaviviruses not characteristic for Russia are annually diagnosed among residents of the Russian Federation travelling abroad, and their number is steadily growing. Areas of mixed flavivirus foci expand.

Methods currently used to create flavivirus vaccines include: different approaches based on genome-free virus-like particles; attenuated live viruses, which are chimeras of two flaviviruses with introduced attenuating mutations; reproduction defective viruses capable of only one cycle of replication in cells; viruses incapable of reproduction in the central nervous system and arthropods due to the introduction of sites for miRNAs.

Thus, recently the number of flavivirus infections requiring prophylaxis is increasing, risk groups requiring

prophylaxis are also expanding dramatically due to the formation of urban foci, the number of mixed foci is increasing, which in turn increases the risk of ADE. All of the above along with the high cost of vaccination programs requires new approaches to the creation of vaccine preparations that will be based on good knowledge of the biology of flaviviruses, the patterns of formation of post-vaccination and post-infection immune response and the use of modern technologies. Such approaches may include: the creation of complex vaccines that provide protection against several flaviviruses at once; assessment of the possibility of using vaccines based on one flavivirus as a surrogate for protection against other flaviviruses (the vaccine protects against the severe course of the disease and complications); development of a universal technology for the preparation of vaccines and creation of a bank of well-characterized seed viruses allowing quick transition to manufacturing of new vaccines.

БИОИНФОРМАТИКА И IT

BIOINFORMATICS AND IT

БОЛЬШИЕ МАССИВЫ ДАННЫХ

BIG DATA

1. САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA, КОДИРУЮЩИЕ ОЛИГОПЕПТИДЫ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА TCP РАСТЕНИЙ, Рахметуллина А.К., Иващенко А.Т.	333
BINDING SITES OF miRNAs WITH mRNAs ENCODING OLIGOPEPTIDES OF PROTEINS OF THE TCP FAMILY OF PLANTS, Rakhmetullina A.K., Ivashchenko A.T.	334
2. СВЯЗЫВАНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА С ЭСТРОГЕНАМИ И АНТИЭСТРОГЕНАМИ: ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ДОКИНГА, Островерхова Д.С., Кадочников В.В., Молдогазиева Н.Т., Порозов Ю.Б.	335
BINDING OF HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN WITH ESTROGENS AND ANTIESTROGENS: MOLECULAR MODELING AND DOCKING STUDY, Ostroverkhova D.S., Kadochnikov V.V., Moldogazieva N.T., Porozov Y.B.	336
3. ВЕБ СЕРВИС ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МОДЕЛЕЙ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ, Л.А.Столбов, Д.С.Дружиловский, Д.А.Филимонов, А.В.Рудик, В.В.Поройков	337
WEB-SERVICE FOR ANTIRETROVIRAL ACTIVITY PREDICTION BASED ON MODELS OF QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS, L.Stolbov, D.Druzhilovskiy, D.Filimonov, A.Rudik, V.Poroikov	338
4. ВИРТУАЛЬНЫЙ ПАЦИЕНТ, Киселев И.Н., Кутумова Е.О., Колпакова А.Ф., Колпаков Ф.А.	339
WEB-SERVICE FOR ANTIRETROVIRAL ACTIVITY PREDICTION BASED ON MODELS OF QUANTITATIVE STRUCTURE-VIRTUAL PATIENT, Kiselev I.N., Kutumova E.O., Kolpakova A.F., Kolpakov F.A.	340
5. ГЕНЫ МЫШИ, ПОТЕРЯННЫЕ У ГРЫЗУНОВ И ПРИМАТОВ С ВЫСОКОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ, Рубанов Л.И., Шиловский Г.А., Селиверстов А.В., Зверков О.А., Любецкий В.А.	341
MOUSE GENES LOST IN RODENT AND PRIMATE SPECIES WITH LONG LIFESPAN, Rubanov L.I., Shilovsky G.A., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Lyubetsky V.A.	342
6. ИНТЕГРАЦИЯ В БАЗАХ ДАННЫХ НАУК О ЖИЗНИ, Василенко А.Н., Василенко М.А., Кочкина Г.А., Ступарь О.С., Озерская С.М.	343
DATA INTEGRATION IN LIFE SCIENCE DATABASES, Vasilenko A.N., Vasilenko M.A., Kochkina G.A., Stupar O.S., Ozerskaya S.M.	343
7. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ПОЧТИ ИЗОГЕННОЙ ЛИНИИ ЯЧМЕНЯ С ЧАСТИЧНЫМ АЛЬБИНИЗМОМ, Шмаков Н.А., Глаголева А.Ю., Афонников Д.А., Хлесткина Е.К.	344
INVESTIGATING TRANSCRIPTOME OF BARLEY NEARLY ISOGENIC LINE WITH PARTIAL ALBINISM, Shmakov N.A., Glagoleva A.Y., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K.	345
8. КЛАСТЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ СУБТИПА HER2 РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, Айсина Д.Е.	345
CLUSTER ORGANIZATION OF miRNA WITH mRNA GENES HER2 SUBTYPE BREAST CANCER, Aisina D.E.	346
9. КОМПЬЮТЕРНАЯ ОЦЕНКА НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ, Иванов С.М., Лагунин А.А., Филимонов Д.А., Поройков В.В.	347
COMPUTER ASSESSMENT OF CARDIOVASCULAR ADVERSE EFFECTS OF DRUG-DRUG INTERACTIONS, Ivanov S.M., Lagunin A.A., Filimonov D.A., Poroikov V.V.	348
10. ЛИНЕЙНЫЙ АЛГОРИТМ РЕКОНСТРУКЦИИ ХРОМОСОМНЫХ СТРУКТУР, Горбунов К.Ю., Любецкий В.А.	349
LINEAR ALGORITHM FOR RECONSTRUCTION OF CHROMOSOME STRUCTURES, Gorbunov K.Yu., Lyubetsky V.A.	350
11. МАШИННОЕ ОБУЧЕНИЕ В АНАЛИЗЕ МИКРОБИОТЫ: МЕЖИНДИВИДУАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОТВЕТА НА ИЗМЕНЕНИЕ ДИЕТЫ, Клименко Н.С., Попенко А.С., Алексеев Д.Г., Тяхт А.В.	351

MACHINE LEARNING FOR MICROBIOTA ANALYSIS: INTERINDIVIDUAL VARIABILITY OF THE RESPONSE TO DIETARY INTERVENTION, Klimenko N. S., Popenko A. S., Alexeev D. G., Tyakht A. V.	352
12. МЕТОД МОРФОМЕТРИИ КОЛОСА ПШЕНИЦЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ, Комышев Е.Г., Генаев М.А., Афонников Д.А.	353
THE METHOD OF WHEAT SPIKE MORPHOMETRY BASED ON IMAGE ANALYSIS, Komyshev E.G., Genaev M.A., Afonnikov D.A.	354
13. МОДЕЛИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ, ПОСТРОЕННЫЕ НА ИНФОРМАЦИИ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ И СТРУКТУРЕ, ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ СТРУКТУР СТЕБЕЛЬ-ПЕТЛЯ НА 3'-КОНЦАХ ТРАНСПОЗОНОВ L1 И ALU В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА, А. Заикин, А. Шеин, М. Попцова	355
SEQUENCE-BASED AND STRUCTURE-BASED MACHINE-LEARNING MODELS FOR RECOGNITION OF 3'-END L1 AND ALU STEM-LOOPS IN HUMAN GENOME, A. Zaikin, A. Shein, M. Poptsova	356
14. МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ПРОКАРИОТ В ПРОСТРАНСТВЕННО-ГЕТЕРОГЕННЫХ СРЕДАХ БЕЗ И ПРИ ФАГОВОЙ ИНФЕКЦИИ, Матушкин Ю.Г., Клименко А.И., Мустафин З.С., Лашин С.А.	357
MODELING THE EVOLUTION OF METABOLISM OF PROKARYOTES IN SPATIALLY HETEROGENEOUS ENVIRONMENTS, WITH AND WITHOUT PHAGE INFECTION, Matushkin Yu.G., Klimenko A.I., Mustafin Z.S., Lashin S.A.	358
15. НЕЙРОСЕТЕВАЯ МОДЕЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ RAGE–NF-KB, Васильев П.М., Спасов А.А., Яналиева Л.Р., Кочетков А.Н., Ворфоломеева В.В., Клочков В.Г., Аппазова Д.Т.	359
NEURAL NETWORK MODEL OF THE RAGE–NF-KB SIGNALING PATHWAY, Vassiliev P.M., Spasov A.A., Yanalieva L.R., Kochetkov A.N., Vorfolomeeva V.V., Klochkov V.G., Appazova D.T.	359
16. ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ ИМЕЮЩИХ НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОВТОРЫ, Белкожаев А.М., Ниязова Р.Е.	360
FEATURES OF miRNA BINDING WITH mRNA OF GENES HAVING NUCLEOTIDE REPEATS, Belkozhaev A.M., Niyazova R.E.	361
17. ПОИСК НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК КАК НУКЛЕОСОМНЫХ БАРЬЕРОВ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ, Теванян Э.А., Попцова М.С.	362
SEARCHING FOR NON-B-DNA STRUCTURES AS NUCLEOSOME BARRIERS WITH MACHINE LEARNING METHODS, E. A. Tevanyan, M. S. Poptsova	363
18. ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ В «СКРЫТОЙ» ЧАСТИ ТРАНСКРИПТОМОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, М.А. Генаев, Н.А. Шмаков, З.С. Мустафин, А.М. Мухин, Д.К. Константинов, А.В. Дорошков, С.А. Лашин, Д.А. Афонников	364
SEARCH FOR NEW GENES IN THE "HIDDEN" PART OF AGRICULTURAL PLANT TRANSCRIPTOMES, M.A. Genaev, N.A. Shmakov, Z.S. Mustafin, A.M. Mukhin, D.K. Konstantinov, A.V. Doroshkov, S.A. Lashin, D.A. Afonnikov	365
19. ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ЗНАНИЯ ИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ АССОЦИАЦИЙ С ПОМОЩЬЮ ПЛАТФОРМЫ GWAS-MAP, Т.И.Шашкова, Д.Д.Горев, Я.А.Цепилов, Е.Д.Пахомов, А.А. Торгашева, П.Джоши, Ю.С.Аульченко	366
OBTAINING NEW BIOLOGICAL KNOWLEDGE FROM THE RESULTS OF GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES USING THE GWAS-MAP PLATFORM, T.Shashkova, D.Gorev, Y.Tsepilov, E.Pakhomov, A.Torgasheva, P.Joshi, Y.Aulchenko	369
20. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА «БОЛЬШИХ ДАННЫХ» ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ АНТИ-ВИЧ СОЕДИНЕНИЙ, П.И.Савосина, Л.А.Столбов, Д.С.Дружиловский, Д.А.Филимонов, В.В.Пороиков	373
DEVELOPMENT OF METHODS FOR BIG-DATA ANALYSIS TO DISCOVER NEW ANTI-HIV COMPOUNDS, P.Savosina, L.Stolbov, D.Druzhilovskiy, D.Filimonov, V.Poroikov	374
21. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СИСТЕМ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ В ОБРАЗЦАХ ИЗ МИРОВОГО ОКЕАНА, М. Хачатурян, И. Русинов, А. Ершова	376
DISTRIBUTION OF RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEMS GENES IN SAMPLES OF THE WORLD OCEAN, M. Khachatryan, I. Rusinov, A. Ershova	377
22. РОЛЬ АМИЛОИДОГЕНЕЗА В ЗАПАСАНИИ БЕЛКА В СЕМЕНАХ РАСТЕНИЙ, Нижников А.А., Белоусов М.В., Белоусова М.Е., Косолапова А.О., Штарк О.Ю., Антонец К.С.	378
THE ROLE OF AMYLOIDOGENESIS IN THE PROTEIN STORAGE IN PLANT SEEDS, Nizhnikov A.A., Belousov M.V., Belousova M.E., Kosolapova A.O., Stark O.Yu., Antonets K.S.	378
23. САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА МЫВ ЖИВОТНЫХ, Мырзабекова М.О.	379

BINDING SITES miRNA WITH mRNA GENES OF FAMILY MYB ANIMALS, Myrzabekova M.O.	380
24. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ СЕМЕЙСТВА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S1, СОДЕРЖАЩИХ РАЗНОЕ КОЛИЧЕСТВО СТРУКТУРНЫХ ДОМЕНОВ, Галзитская О.В., Селиванова О.М., Мачулин А.В. Дерюшева Е.И.	381
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CLASSIFICATION OF THE S1 RIBOSOMIC PROTEIN FAMILY CONTAINING A DIFFERENT NUMBER OF STRUCTURED DOMAINS, Galzitskaya O.V., Selivanova O.M., Machulin A.V, Deryusheva E.I.	381
25. ТРИ ДЕСЯТИЛЕТИЯ КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ PASS: ОТ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СПЕКТРОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДО СИСТЕМНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ, Поройков В. В., Филимонов Д. А., Глоризова Т.А., Лагунин А.А., Дружиловский Д.С., Рудик А.В., Дмитриев А.В., Тарасова О.А., Иванов С.М., Погодин П.В.	382
THREE DECADES OF COMPUTER PROGRAM PASS: FROM PREDICTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY SPECTRA TO SYSTEMS PHARMACOLOGY, Poroikov V.V., Filimonov D.A., Glorizova T.A., Lagunin A.A., Druzhilovskiy D.S., Rudik A.V., Dmitriev A.V., Tarasova O.A., Ivanov S.M., Pogodin P.V.	384
26. ХАРАКТЕРИСТИКА САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA-5p И miRNA-3p С mRNA ГЕНА RTL1, Юрикова О.Ю., Атамбаева Ш.А.	385
CHARACTERISTICS OF THE BINDING SITES OF miRNA-5p AND miRNA-3p WITH mRNA OF RTL1 GENE, Yurikova O.Yu., Atambayeva Sh.A.	386
27. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ РАКА ТОНКОГО КИШЕЧНИКА, Акимниязова А.Н.	387
CHARACTERISTICS OF miRNAs INTERACTION WITH mRNAs OF CANDIDATE GENES IN SMALL INTESTINAL CANCER, Akimniyazova A.N.	388
28. ХАРАКТЕРИСТИКИ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ MIRNA В MRNA ГЕНОВ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ, Пинский И.В., Лабейт З., Иващенко А.Т.	389
CHARACTERISTICS OF MIRNA BINDING SITES IN MRNAS OF HUMAN AND MOUSE MYOCARDIAL CONTRACTILE PROTEIN GENES, Pinsky I.V., Labeit S., Ivashchenko A.T.	390
29. GTRD – БАЗА ДАННЫХ ПО РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ, Евшин И.С., Шарипов Р.Н., Колмыков С.К., Кондрахин Ю.В., Колпаков Ф.А.	391
GTRD: A DATABASE ON GENE TRANSCRIPTION REGULATION, Yevshin I.S. Sharipov R.N., Kolmykov S.K., Kondrakhin Yu.V., Kolkpakov F.A.	392

УДК 577.21

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA, КОДИРУЮЩИЕ ОЛИГОПЕПТИДЫ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА TCP РАСТЕНИЙ

Рахметуллиная А.К., Иващенко А.Т.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан
050040, Алматы, пр. аль-Фараби, 71
e-mail: a.iavashchenko@gmail.com

Установлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов TCP растений. Сайты связывания miRNA в mRNA генов TCP кодируют олигопептиды полисерин, полигистидин, полиаланин, полиглицин.

Ключевые слова: miRNA; mRNA; сайт связывания; олигопептид; транскрипционный фактор

Транскрипционные факторы участвуют во многих процессах развития и роста растений. Семейство генов транскрипционных факторов TCP включает 4187 генов различных видов растений. Гены семейства TCP участвуют в апикальном доминировании, в контроле цветовой двусторонней симметрии, вовлечены в репликацию и восстановление ДНК, поддерживают структуру хроматина, сегрегацию хромосом и регулируют клеточный цикл [1]. Многие из этих процессов регулируются посредством miRNA подавляющих экспрессию генов мишеней. Было показано участие miRNA в реакции растений на стресс и действие патогенов [2].

to stress and the action of pathogens has been shown [2].

The nucleotide sequences of genes of the TCP family were borrowed from Plant Transcription Factor Database v4.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>). The nucleotide sequences of miRNAs were taken from miRBase v.22 (<http://www.mirbase.org/>). The miRNAs binding sites in mRNA of genes were predicted using the MirTarget program.

The quantitative characteristics of 429 miRNAs binding to mRNAs of 27 TCP family genes of the *A. thaliana* were established. Polyserine, polyhistidine were detected in the TCP proteins, encoded respectively by the binding sites of ath-miR5021-5p, ath-miR5658-5p, which are conserved in orthologous proteins. The binding of 738 miRNA to mRNA of 22 genes of the TCP family genes of the *O. sativa* was detected. osa-miR2102-5p binding sites encoded conservative hexapeptides polyalanine and polyglycine. The ath-miR5021-5p binding sites in the mRNA of the three *A. thaliana* genes and 27 orthologous genes were found encode the SSSSSS oligopeptide. AA54G00421 protein of the *A. thaliana* contains decaserin, twelve proteins contain octaserin, and five proteins contain heptaserin. It was revealed that the ath-miR5658-5p binding sites encode HHHHHH oligopeptide in 22 proteins. Polyhistidine is conserved in TCP proteins encoded by the corresponding genes. The binding sites ath-miR5658-5p in mRNA *Bostr.0124s0115.1.p*, *GSBRNA2T00009950001*, *Tp1g39800* genes encode octagistidine, and *Thecc1EG031706T1* - decagistidine. The ath-miR5658-5p binding sites were sequentially arranged. It was found that the binding sites of some miRNA have homologous nucleotide sequences that can be read in different open reading frames. The nucleotide sequence of the binding sites of osa-miR2102-5p GCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG in the first reading frame encodes the AAAAAAAAAA oligopeptide, and in the third reading frame osa-miR2102-5p encodes the oligopeptide GGGGGGGG. In some TCP proteins of *A. thaliana*, *O. sativa subsp. japonica*, *T. aestivum*, *Z. mays* polyglutamine, polythreonine, polyasparagine polyproline, polyaspartic acid were detected. These oligopeptides can be encoded by the binding sites of still undetected miRNAs. In the genes of animals, these oligopeptides are encoded by miRNA binding sites, including polyglutamine, polythreonine, polyasparagine, polyproline. The main properties of miRNAs' interactions with mRNA genes in plants and animals are very similar, which indicates the similarity of regulation of gene expression through miRNA in members of different kingdoms of eukaryotic organisms. The results obtained in the present work show that the expression of TCP family genes can be regulated by miRNA binding to their mRNA.

References:

1. Jin J., Tian F., Yang D., Meng Y., Kong L., Luo J., Gao G. Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants // *Nucleic Acids Research*. 2017. Vol. 45. № 1. P. 1040-1045.
2. Catalanotto C., Cogoni C., Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions // *Int J Mol Sci*. 2016. Vol. 17. № 10. P. 1712-1729.
3. Ivashchenko A. T., Pyrkova A. Y., Niyazova R. Y., Alybayeva A., Baskakov K. Prediction of miRNA binding sites in mRNA // *Bioinformatics*. 2016. Vol. 12. № 4. P. 237-240.

УДК 577.3

СВЯЗЫВАНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА С ЭСТРОГЕНАМИ И АНТИЭСТРОГЕНАМИ: ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ДОКИНГА

Острроверхова Д.С.¹, Кадочников В.В.¹, Молдогазиева Н.Т.¹, Порозов Ю.Б.^{1,2}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2
e-mail: crossingoverjump@gmail.com

²Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия 197101, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д.49

Выявлено, что для эстрогенов, имеющих жесткую пространственную структуру, эффективность и аффинность связывания выше, чем для антиэстрогенов, для которых характерна большая конформационная гибкость. Такие структурные особенности могут обуславливать также различия в связывании эстрогенов и антиэстрогенов с рецептором ЭР-альфа.

Ключевые слова: гомологическое моделирование; альфа-фетопротеин; эстрогены; антиэстрогены; докинг; молекулярная динамика

α -Фетопротеин (АФП) является основным эмбрио-специфичным и ассоциированным с опухолью белком млекопитающих, который также присутствует в небольших количествах при нормальных условиях у взрослых [1]. Несмотря на значительный успех в изучении АФП, его трехмерная структура, механизмы связывания рецептора наряду со структурой рецептора и, что является наиболее важным, его биологическая роль в эмбрио- и канцерогенезе, остается неясной. Предположительно, АФП содержит два эстрогенсвязывающих участка – с высокой и низкой аффинностью [2,3]. Однако, строение эстрогенсвязывающих участков и характер связывания остаются неизученными. К тому же, в настоящее время экспериментальными методами (рентгеноструктурный анализ и ЯМР-спектроскопия) не удается изучить пространственную структуру АФП. В базе данных PDB имеются 3D структуры сывороточного альбумина, к семейству которого принадлежит АФП, что позволяет построить модель его пространственной структуры на основе гомологии [4].

Последовательность аминокислот АФП человека была получена с универсальных белковых ресурсов (Uniprot и PDB). В качестве шаблона для построения по гомологии использовался человеческий сывороточный альбумин, полученный из Protein Data Bank. Модель АФП человека была построена с помощью Prime программного пакета Schrödinger Suite [5]. Построенная 3D структура была оптимизирована с использованием молекулярной динамики в Desmond в Schrödinger Suite.

Молекулярный докинг проводился в программе Glide в Schrödinger Suite. Всего 6 лигандов, из которых 3 эстрогена (эстрон, диэтилстильбэстрол, эстрадиол) и 3 антиэстрогена (тамоксифен, 4-гидрокси-тамоксифен и N-десметил-4-гидрокси-тамоксифен), были выбраны для проведения анализа с помощью докинга.

Молекулярная динамика выполнялась для 6 комплексов АФП с лигандом в течение 100 наносекунд для каждого комплекса.

Трехмерная структура АФП человека имеет V-образную форму, образованную тремя доменами I, II, III. Валидация модели с использованием карт Рамачандрана и графиков RMSD и RMSF показали ее высокую достоверность. Между вторым и третьим доменами содержится полость, на дне которой обнаружен тоннель диаметром 9 ангстрем. В полученной модели выявлены несколько возможных сайтов связывания лигандов. Эффективность и аффинность связывания были оценены с использованием параметров GlideScore, eModel. Для эстрадиола и эстрогена, имеющих жесткую пространственную структуру, значения этих параметров были выше, чем для тамоксифена и его производных, для которых характерна большая конформационная гибкость. Выявлены аминокислотные остатки участвующие во взаимодействии. Эти структурные особенности могут обуславливать также различия в связывании эстрогенов и антиэстрогенов с рецептором ЭР-альфа. Это может иметь также важное значение в поиске новых лекарств для лечения эстрогензависимых опухолей.

Литература:

1. Молдогазиева Н.Т. Конформационная динамика альфа-фетопротеина, его пептидных фрагментов и их биологическая активность: Автореф. дис. д. б. наук. – М, 2013. – 378 с.
2. Terentiev A.A., Moldogazieva N.T. Structural and functional mapping of alpha-fetoprotein // *Biochemistry*. 2006. 71:120132.
3. Terentiev A.A. and Moldogazieva N.T. Alpha-fetoprotein: a renaissance // *Tumour Biology*. 2013. 34, 2075–2091.
4. Terentiev A.A., Moldogazieva N.T., Levtsova O.V., Maximenko D.M., Borozdenko D.A., Shaitan K.V. Modeling of three dimensional structure of human alpha-fetoprotein complexed with diethylstilbestrol: docking and molecular dynamics simulation study // *Bioinform Comput Biol*. 2012. 10(2):1241012
5. Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.

UDC 577.3

BINDING OF HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN WITH ESTROGENS AND ANTIESTROGENS: MOLECULAR MODELING AND DOCKING STUDY

Ostroverkhova D.S.¹, Kadochnikov V.V.¹, Moldogazieva N.T.¹, Porozov Y.B.^{1,2}

¹First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow, Russia
 119991, Moscow, st. Trubetskaya, 8, p. 2
 e-mail: crossingoverjump@gmail.com

²St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russia
 197101, St. Petersburg, Kronverksky Avenue, 49

It is revealed that for estrogens with a rigid spatial structure, the efficiency and affinity of binding are higher than for antiestrogens, which are characterized by high conformational flexibility. Such structural properties may also cause differences in the binding of estrogens and antiestrogens to the ER-alpha receptor.

Key words: homology-based modeling; alpha-fetoprotein; estrogens, antiestrogens, docking, molecular dynamics

α -Fetoprotein (AFP) is a major mammalian embryo-specific and tumor-associated protein that is also present in small quantities in adults at normal conditions [1]. Despite the significant success in study of AFP, its three-dimensional structure, mechanisms of receptor binding along with a structure of the receptor itself and, what is the most important, its biological role in embryo- and carcinogenesis remain still obscure. Apparently, AFP contains two estrogen binding sites with high and low affinity [2,3]. However, a structure of the estrogen binding sites and a nature of a binding remain unexplored. Moreover, it is not possible to study the dimensional structure of AFP, using experimental methods (X-ray diffraction analysis and NMR spectroscopy) at the present time. The Protein Data Bank contains 3D structures of serum albumin, to the family of which AFP belongs, which makes it possible to build a model of its dimensional structure based on homology [4].

The sequence of human AFP was downloaded from the universal protein resources (Uniprot and PDB). Human serum albumin obtained from Protein Data Bank was used for a template for homology-based modeling. The model of human AFP was built with Prime in Schrödinger Suite [5]. The initial 3D structure of AFP was optimized using molecular dynamics simulation with Desmond in Schrödinger Suite. Molecular docking was performed with Glide in Schrödinger Suite. Only 6 ligands, of which 3 estrogens (estrone, diethylstilbestrol, estradiol) and 3 antiestrogens (tamoxifen, 4-hydroxy-tamoxifen and N-desmethyl-4-hydroxy-tamoxifen) were selected for docking analysis. Molecular dynamics was performed for up to 100 nanoseconds for 6 complexes of AFP with a ligand.

The three-dimensional structure of human AFP has a V-shape formed by three domains I, II, III. The validation of the model using Ramachandran plots, RMSD and RMSF graphs showed its high accuracy. A cavity was contained between the second and third domains. A tunnel with a diameter of 9 angstroms was found at its bottom. The number of possible binding sites was identified in the resulting model. An efficiency and a binding affinity were evaluated using GlideScore and eModel parameters. For estrone and 17- β estradiol, which have rigid structure values of the above-mentioned parameters were higher than those for tamoxifen and its derivatives that possess higher conformational flexibility. Amino acid residues involved in the interaction were identified. These structural properties might also differ in the binding of estrogens and antiestrogens to the ER- α receptor. It may also be important in the search for new drugs for the treatment of estrogen-dependent tumors.

References:

1. Moldogazieva N.T. Conformational dynamics of alpha-fetoprotein, its peptide fragments and their biological activity: *Avtoref. dis. d.b.sc.* - M, 2013. - 378 p.
2. Terentiev A.A., Moldogazieva N.T. Structural and functional mapping of alpha-fetoprotein // *Biochemistry*. 2006. 71:120132.
3. Terentiev A.A. and Moldogazieva N.T. Alpha-fetoprotein: a renaissance // *Tumour Biology*. 2013. 34, 2075–2091.
4. Terentiev A.A., Moldogazieva N.T., Levtsova O.V., Maximenko D.M., Borozdenko D.A., Shaitan K.V. Modeling of three dimensional structure of human alpha-fetoprotein complexed with diethylstilbestrol: docking and molecular dynamics simulation study // *Bioinform Comput Biol*. 2012. 10(2):1241012
5. Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.

УДК: 544.165

ВЕБ СЕРВИС ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МОДЕЛЕЙ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ

Л.А. Столбов, Д.С. Дружиловский, Д.А. Филимонов, А.В. Рудик, В.В. Поройков

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Российская Федерация, Москва, Москва, Погодинская, 10, e-mail: stolbovla@yandex.ru

Создан общедоступный веб-сервис «Anti-HIV Agents Prediction», прогнозирующий биологическую активность с целью поиска препаратов для терапии ВИЧ инфекции и сопутствующих осложнений. Прогноз основан на моделях количественных взаимосвязей структура-активность, созданных с использованием компьютерной программы GUSAR; прогноз фармакологических эффектов, связанных с терапией ВИЧ-ассоциированных заболеваний реализован с использованием программы PASS.

Ключевые слова: ВИЧ-1; обратная транскриптаза; протеаза; интеграза; количественные взаимосвязи структура-активность; веб-сервис

Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) используется для лечения ВИЧ инфекции, ингибируя вирус на всех стадиях его жизненного цикла. Недостаточная терапевтическая эффективность и серьезные побочные эффекты, а также возникновение резистентных штаммов обуславливают необходимость поиска новых ингибиторов ВИЧ. Прогнозирование ингибирования молекулярных мишеней ВИЧ лекарственно-подобными соединениями является важным этапом на начальных стадиях создания лекарственного препарата, повышающим эффективность позволяющим снизить временные и финансовые затраты исследований и разработок.

Для создания количественных моделей взаимосвязи структура-активность нами извлечены и проанализированы экспериментальные данные, представленные в базе данных ChEMBL (версия 24). Первичные данные были обработаны согласно современным рекомендациям: удалены потенциальные дубликаты, данные об активности проверены с учетом информации из оригинальных статей, и т.д. Для представленных в базе данных мишеней ВИЧ-1 (протеаза, обратная транскриптаза, интеграза и др.) были созданы обучающие выборки, использующие в качестве показателей активности IC₅₀ и K_i.

QSAR модели построены с использованием программы GUSAR (Filimonov D.A. et al., 2009). Точность и предсказательную способность моделей оценивали на основе скользящего и перекрестного контроля. Качественные показатели моделей характеризуются величинами R² в интервале от 0.85 до 0.94 и Q² в интервале от 0.75 до 0.82.

Веб-сервис «Anti-HIV Agents» Prediction (<http://www.way2drug.com/hiv>) для прогнозирования ингибирующей активности мишеней ВИЧ-1 использует данные модели и предоставляет результат для лекарственно-подобного соединения, структуру которого вводит пользователь через графический интерфейс.

ВИЧ инфекция обычно сопровождается значительным количеством сопутствующих заболеваний и осложнений. Поэтому в рамках разработанного нами веб-сервиса было необходимо также обеспечить возможности прогнозирования видов биологической активности, связанных с лечением ВИЧ-ассоциированных заболеваний. Такой прогноз реализован на основе компьютерной программы PASS (Филимонов и др., 2014, 2018), предсказывающей 83 вида биологической активности со средней точностью 92%.

Реализован свободно-доступный в сети Интернет веб-сервис для прогнозирования видов биологической активности лекарственно-подобных соединений, с целью терапии ВИЧ-инфекции и ВИЧ-ассоциированных заболеваний. Этот веб-сервис может быть использован для поиска и разработки новых антиретровирусных препаратов с мультитаргетными механизмами действия.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ-НИН № 17-54-30015-НИЗ_а.

Литература:

1. Филимонов Д. А., Лагунин А. А., Глориозова Т. А., Рудик А. В., Дружиловский Д. С., Погодин П. В., Пороиков В. В. // Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS Online. Хим. гетероцикл. соедин. – 2014. – № 3. – С. 483-499.
2. Филимонов Д.А., Дружиловский Д.С., Лагунин А.А., Глориозова Т.А., Рудик А.В., Дмитриев А.В., Погодин П.В., Пороиков В.В. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения // Biomed. Chem. Res. Meth. – 2018. - № 1. – С. e00004.
3. Filimonov D. A., Zakharov A. V., Lagunin A. A., Poroikov V. V. QNA based "Star Track" QSAR approach. SAR QSAR Environ. Res. 2009. Vol. 20. № 7-8. P. 679-709.

UDC: 544.165

WEB-SERVICE FOR ANTIRETROVIRAL ACTIVITY PREDICTION BASED ON MODELS OF QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS

L.A. Stolbov, D.S. Druzhilovskiy, D.A. Filimonov, A.V. Rudik, V.V. Poroikov

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Federation, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 10
 e-mail: stolbovla@yandex.ru

A freely available web-service «Anti-HIV Agents Prediction» has been developed to predict the biological activity for therapy of HIV infection and HIV-associated comorbidities. Prediction is based on the models of structure-activity relationships, created with GUSAR program; prediction of pharmacological effects related to HIV-associated comorbidities is realized using computer program PASS.

Key words: HIV-1; reverse transcriptase; protease; integrase; quantitative structure activity relationship; web-service

Highly active antiretroviral therapy (HAART) is used for HIV infection treatment by inhibition of the virus during each stage of its life cycle. Due to the insufficient therapeutic efficacy, serious side effects and emerging of drug resistant virus strains, the permanent search of new inhibitors for HIV is necessary. Predicting HIV inhibiting activity of drug like compounds on HIV molecular targets is important as a first step in drug discovery which enhances the general efficiency of research and lead to decrease of time and financial expenses during the drug development.

Experimental data for building models of quantitative structure-activity relationships were downloaded from ChEMBL database (version 24) and analyzed. Raw data were carefully curated according to the nowadays recommendations: potential duplicates were removed, data validity was verified from the information presented in the original publications, etc. Data sets with different endpoints (IC₅₀, K_i, etc.) were created for HIV targets (protease, reverse transcriptase, integrase and others).

QSAR models were developed with GUSAR program (Filimonov D.A. et al., 2009). Quantitative characteristics of the models were evaluated with cross-validation procedure having R² from 0.85 to 0.94 and Q² from 0.75 to 0.82.

«Anti-HIV Agents» Prediction service (<http://www.way2drug.com/hiv>) employs these models to predict inhibitory activity against HIV-1 targets providing a prediction for a drug-like compound which is input by user via graphical interface.

HIV infection is commonly entailed by numerous diseases and complications. Taking this fact into account, it was essential to provide an opportunity for our web-service to predict biological activity needed for treatment of HIV-associated comorbidities. This prediction is realized with PASS program (Filimonov D.A. et al., 2014, 2018) and estimates 83 kinds of biological activity with 92% mean accuracy.

We developed freely available via Internet web-service for prediction of biological activities of drug-like compounds, which could be used for treatment of HIV infection and HIV-associated comorbidities. This web-service can be used for discovery and development of new antiretroviral agents with multitarget mechanism of action.

The work is supported by the RFBR-NIH grant No. 17-54-30015-NIH_a.

References:

1. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Rudik A. V., Druzhilovskiy D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Prediction of biological activity of organic compounds using web-resource PASS Online. *Chem. Heterocycl. Compnds.* 2014. № 3. P. 483-499.
2. Filimonov D. A., Druzhilovskiy D. S., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Rudik A. V., Dmitriev A. V., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitations. // *Biomed. Chem. Res. Meth.* 2018. № 1. P. e00004.
3. Filimonov D. A., Zakharov A. V., Lagunin A. A., Poroikov V. V. QNA based "Star Track" QSAR approach. *SAR QSAR Environ. Res.* 2009. Vol. 20. № 7-8. P. 679-709.

УДК: 51-76

ВИРТУАЛЬНЫЙ ПАЦИЕНТ

Киселев И.Н., Кутумова Е.О., Колпакова А.Ф., Колпаков Ф.А.

Институт вычислительных технологий СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, г. Новосибирск, ул. Академика Ржанова, д. 6
e-mail: fkolpakov@gmail.com

Разработана технология построения виртуального пациента и оптимизации выбора лекарственной терапии на примере лечения артериальной гипертензии.

Ключевые слова: виртуальный пациент, математическая модель, артериальная гипертензия, BioUML

Истинная персонализированная медицина должна базироваться на "виртуальном пациенте" - цифровом двойнике реального пациента, который, в идеале, формируется и накапливается в течение всей жизни пациента, как результат его взаимодействия с системой здравоохранения [1].

Нами разработана технология построения виртуального пациента и оптимизации выбора лекарственной терапии на примере лечения артериальной гипертензии. Для достижения этой цели нами было решено 3 основные задачи:

- 1) построение модульной математической модели биохимии и физиологии человека с достаточным

уровнем детализации для заданной болезни, с использованием платформы BioUML [2]. Мы полагаем, что сейчас не реально построить "виртуального пациента" на все случаи жизни. Поэтому наш подход - создать набор основных блоков, а из них собирать модель под заданного пациента и болезнь (как из блоков конструктора Лего). При этом, каждый блок может состоять из множества вложенных в него блоков. На самом нижнем уровне компонентами блоков являются биохимические реакции и дифференциальные уравнения, описывающие изменения соответствующих физиологических параметров.

2) для основных классов антигипертензивных препаратов: прямых ингибиторов ренина (алискирен), блокаторов кальциевых каналов (амлодипин), антагонистов рецепторов ангиотензина II (лозартан, азилсартан), ингибиторов ангиотензин-пре-вращающего фермента (эналаприл, периндоприл, лизиноприл), бета-адренобло-ка-то-ров (биспролол, метопролол) и тиазидоподобных диуретиков были определены их точки воздействия на построенную модель и были построены соответствующие модели фармакокинетики и фармакодинамики. Для валидации модели мы использовали данные клинических исследований, найденные в литературе. Для этого мы сгенерировали популяцию виртуальных пациентов с повышенным артериальным давлением и смоделировали их лечение перечисленными выше антигипертензивными препаратами. Результаты моделирования показали хорошее соответствие клиническим данным.

3) персонализация модели - для задания параметров модели для заданного пациента, мы использовали истории болезни пациентов с артериальной гипертензией. Однако из них нельзя извлечь только малую часть параметров модели. Оставшиеся параметры разделили их на 2 группы: неизвестные персональные параметры (изменения их значений приводит к существенному изменению моделируемых значений систолического и диастолического давления) и остальные параметры - их значения считаются общими для всех виртуальных пациентов. Чтобы решить проблему с неизвестными персональными параметрами строилось множество виртуальных пациентов, при этом известные параметры у этих моделей соответствуют данным заданного пациента, а неизвестные - могут существенно варьировать. После этого проводится "лечение" созданной популяции, т.е. моделирование воздействия указанных выше антигипертензивных препаратов. При этом каждый виртуальный пациент реагирует на "лечение" по своему, не для всех оно будет эффективно. Это позволяет выделить группы виртуальных пациентов со схожей реакцией на лекарственный препарат и определить какие именно параметры определяют разделение на эти группы.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-01-00779.

Литература:

1. Lehrach H. Omics approaches to individual variation: modeling networks and the virtual patient // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2016. Vol. 8. № 3. P. 253-265.
2. Киселев И.Н., Семисалов Б.В., Бибердорф Э.А., Шарипов Р.Н., Блохин А.М., Колпаков Ф.А. Модульное моделирование сердечно-сосудистой системы чело-века // *Математическая биология и биоинформатика.* — 2012. — Т. 7. — № 2. С. 703–736.

UDC: 51-76

VIRTUAL PATIENT

Kiselev I.N., Kutumova E.O., Kolpakova A.F., Kolpakov F.A.

Institute of computational technologies SB RAS, Novosibirsk, Russia
 630090, Novosibirsk, Akademika Rzhanova 6
 e-mail: fkolpakov@gmail.com

We have developed a technology for constructing a virtual patient and optimizing the choice of drug therapy using the example of treating arterial hypertension

Key words: virtual patient, mathematical model, arterial hypertension, BioUML

True personalization of drug therapies will rely on "virtual patient" – digital twin of real patient which, ideally, is formed and accumulated throughout the patient's life, as a result of his interaction with the health care system [1].

We have developed a technology for constructing a virtual patient and optimizing the choice of drug therapy using the example of treating arterial hypertension. To achieve this goal we have solved three main tasks:

1) building a modular mathematical model of human biochemistry and physiology with a sufficient level of detail for a given disease using BioUML technology [2]. We believe that now it is not realistic to build a "virtual patient" for all occasions. Therefore, our approach is to create a set of basic blocks, and from them to assemble a model for a given patient and illness (as from Lego blocks). At the same time, each block may consist of a set

of nested blocks. At the lowest level, the components of the blocks are biochemical reactions and differential or algebraic equations describing changes in the corresponding physiological parameters.

2) for the main classes of antihypertensive drugs: direct inhibitors of renin (aliskiren), calcium channel blockers (human skin), angiotensin II receptor antagonists (losartan, azilsartan), angiotensin-converting enzyme inhibitors (enalapril, perindopril, lisinopril) and thiazide-like diuretics, their points of impact on the constructed model of the human cardiovascular system were determined and corresponding models of pharmacokinetics and pharmacodynamics were constructed. To validate the resulting model, we used data from clinical studies found in the literature. To do this, we generated a population of virtual patients with high blood pressure and modeled their treatment with the above antihypertensive drugs. The decrease in pressure predicted by the model showed good agreement with the clinical data.

3) model personalization - setting the model parameters for a given patient, we used data from clinical studies - we collected and analyzed the medical records of patients with arterial hypertension. However this data can be used to initialize only smallest part of model parameters. The remaining parameters divided them into two groups: unknown personal parameters (fluctuation of the values of these parameters leads to a significant change in the simulated values of systolic and diastolic pressure) and other parameters - their values are considered common to all virtual patients. To solve the problem with unknown personal parameters, a multitude of virtual patients was built, while the known parameters of these models correspond to the data of a given patient, and the unknown ones can vary significantly. After that, the "treatment" of the created population is carried out, i.e. simulation of the effects of the above antihypertensive drugs. In addition, each virtual patient responds to the "treatment" in his own way, it will not be effective for everyone. This allows you to select groups of virtual patients with a similar reaction to the drug and determine which parameters determine the division into these groups.

Work is supported by the grant of the RFBR 16-01-00779.

References:

1. Lehrach H. Omics approaches to individual variation: modeling networks and the virtual patient // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2016. Vol. 8. № 3. P. 253-265.
2. Kiselev I.N., Semisalov B.V., Biberdorf E.A., Sharipov R.N., Blokhin A.M., Kolpakov F.A. Modular modeling of the human cardiovascular system // *Mathematical Biology and Bioinformatics.* 2012. Vol. 7. № 2. P. 703–736.

УДК 575.852

ГЕНЫ МЫШИ, ПОТЕРЯННЫЕ У ГРЫЗУНОВ И ПРИМАТОВ С ВЫСОКОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ

Рубанов Л.И., Шиловский Г.А., Селиверстов А.В., Зверков О.А., Любецкий В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук
127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19 стр. 1.
e-mail: lyubetsk@iitp.ru

Высокая (относительно массы тела) продолжительность жизни отдельных видов грызунов и приматов может быть связана с потерей определённых генов, присутствующих у короткоживущих видов из тех же отрядов. Это согласуется с гипотезой Вильямса о перераспределении физиологических ресурсов организма между самоподдержанием и размножением. Мы выполнили отбор генов, потеря которых сопутствует увеличению продолжительности жизни.

Ключевые слова: продолжительность жизни; долголетие; старение; геронтология; потеря гена; синтения; *in silico* анализ

Известную гипотезу "less is more" можно интерпретировать как важность поиска генов, потеря которых привела к заметным положительным изменениям в эволюции соответствующего вида. Потеря гена понимается здесь как комбинация существенных изменений в его нуклеотидной структуре и геномном контексте. Следуя нашему общему предположению об эволюционной важности потери генов, мы стремились найти гены, отсутствующие у грызунов и приматов с более высокой продолжительностью жизни, чем ожидается на основе их размеров: голого землекопа, галилейского слепыша, дамарского пескороя, белоголового капуцина, орангутанга, белощёкого хохлатого гиббона, бонобо, шимпанзе, саймири и человека. Виды, живущие в разных условиях, рассматривались совместно для уменьшения влияния среды на изучаемое явление. Таким образом, отбирались гены, присутствующие и независимо потерянные

как минимум в двух филогенетических группах. Все рассмотренные 40 видов принадлежат к надотряду Euarchontoglires. Поиск потерянных генов производился *in silico* оригинальным методом, реализованным в компьютерной программе lossgainRSL. Программа является консольным приложением, работающим на платформах Windows и Linux и может осуществлять параллельные вычисления в среде MPI.

Разработанный метод и его программная реализация позволили получить короткий список потерянных генов, предположительно связанных с высокой (относительно массы тела) продолжительностью жизни у представителей Euarchontoglires. Некоторые из обнаруженных генов мыши демонстрируют специфическую экспрессию в репродуктивных тканях, что согласуется с гипотезой Вильямса о перераспределении физиологических ресурсов тела между самоподдержанием и размножением. Потеря некоторых предсказанных генов vomeronazальных и обонятельных рецепторов у человека и голого землекопа согласуется с их специфическими анатомическими особенностями. Мы предполагаем, что эволюционная потеря определённых генов является одним из важных факторов, определяющих продолжительность жизни и старение, включая неотению.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-13037. Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МЦЦ РАН).

UDC 575.852

MOUSE GENES LOST IN RODENT AND PRIMATE SPECIES WITH LONG LIFESPAN

Rubanov L.I., Shilovsky G.A., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Lyubetsky V.A.

Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow, Russia

Bolshoy Karetny per. 19, build.1, Moscow 127051 Russia

e-mail: lyubetsk@iitp.ru

A long (relative to body weight) lifespan in individual rodent and primate species can be due to the loss of particular genes that are present in short-lived species of the same orders. This agrees with the Williams' hypothesis concerning the reallocation of physiological resources of an organism between self-maintenance and reproduction. We have performed the screening for gene losses that can accompany increased lifespan.

Key words: lifespan; longevity; aging; gerontology; gene loss; synteny; *in silico* analysis

The well-known "less is more" hypothesis can be interpreted as the significance of screening for lost genes, which nevertheless led to largely positive evolutionary events for the species. Gene losses are considered as a combination of significant changes in its nucleotide structures as well as significant changes in the associated synteny. Following our general hypothesis on the evolutionary significance of gene loss, we tried to identify lost genes in the mole-rats and primates with a longer lifespan than could be expected from their body size: naked mole-rat, Upper Galilee mountains blind mole rat, Damaraland mole rat, white-headed capuchin, orangutan, northern white-cheeked gibbon, bonobo, chimpanzee, saimiri, and human. Species living under different conditions were analyzed together to reduce the habitat impact on the phenomenon studied. Specifically, the genes independently present and lost in at least two phylogenetic groups were selected. All 40 species considered here belong to the superorder Euarchontoglires. Lost genes have been searched *in silico* using our method. The program lossgainRSL was implemented as a command line utility for Windows/Linux. It can perform parallel computing in MPI environment.

The developed method and its software allowed us to identify a short list of presumably lost genes associated with long, relatively to body weight, lifespan in Euarchontoglires. Some of the predicted lost genes in mouse demonstrate specific expression in reproductive tissues, which agrees with the Williams' hypothesis concerning the reallocation of the body physiological resources between self-maintenance and reproduction. The loss of some predicted vomeronasal and olfactory receptor genes in human and naked mole-rat conforms to their specific anatomical features. We suggest that the loss of certain genes in evolution is one of the essential determinants of lifespan and aging including neoteny.

The computations were carried out on MVS-10P at Joint Supercomputer Center of the Russian Academy of Sciences (JSCC RAS). The reported study was funded by RFBR according to the research project No. 18-29-13037.

УДК 005.65

ИНТЕГРАЦИЯ В БАЗАХ ДАННЫХ НАУК О ЖИЗНИ

Василенко А.Н., Василенко М.А., Кочкина Г.А., Ступарь О.С., Озерская С.М.

Обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН - Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
142290, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, дом 5
e-mail: vanvkm@gmail.com

Представлены результаты проведенного в ВКМ ИБФМ РАН исследования особенностей интеграции в глобальной системе баз данных Наук о Жизни с открытым доступом.

Ключевые слова: базы данных, Науки о Жизни, коллекции микроорганизмов

Доклад представляет результаты исследования форм и особенностей внутренней интеграции в глобальной системе баз данных Наук о Жизни с открытым доступом. Работа выполнена в отделе ВКМ института ИБФМ РАН

Общее число обнаруженных баз данных - около 20000, из них 2669 были изучены и собраны в нашей Метабазе. Основной наш интерес заключается в базах данных о микроорганизмах, поэтому их взаимосвязи изучены детальнее: по типам знаний, представленных в них, по партнерским базам данных, по использованным онтологиям, по методам доступа компьютерными программами. Мы также исследовали соответствие баз данных детальным рекомендациям Европейской Экспертной группы FAIR и обнаруженные несогласования будут доложены в докладе.

Графически сеть исследованных баз похожа на LOD Cloud, но значительно больше по объему.

Для большей эффективности исследования мы разработали скрипты data-mining на языке Питон. С их помощью уже исследованы базы данных, включенные в системы EMBL-EBI, NCBI, KEGG и ExPASy. Разработанная система практична, она позволила найти информацию в 59 базах данных Наук о Жизни для 622 штаммов микроорганизмов ВКМ.

Приципы работы были доложены на рабочем совещании по проекту CORBEL Европейской Биомедицинской Системы и рекомендованы к включению в проект EOSC-Life системы H2020 для следующего этапа интеграции баз данных Наук о Жизни с системой гарантированного сохранения микроорганизмов в коллекциях культур. ВКМ ИБФМ РАН включена в Рабочие пакеты 1, 2 и 6. Проект одобрен и начинает работать в марте 2019.

Исследование специализируется в таких областях прикладного использования как патентная система, здравоохранение, фармакология, сельское хозяйство и др. В докладе будут представлены результаты проведенных нами ранее исследований в части биоремедиации (проект «BRIO - Belgian-Russian Initiative on Rio objectives. Set up of a network for banking rhizosphere micro – biodiversity», 7-я Рамочная Программа научных исследований Евросоюза).

UDC 005.65

DATA INTEGRATION IN LIFE SCIENCE DATABASES

Vasilenko A.N., Vasilenko M.A., Kochkina G.A., Stupar O.S., Ozerskaya S.M.

G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences (IBPM RAS)
Prospect Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia
e-mail: vanvkm@gmail.com

The current report presents VKM IBPM RAS results of the study of integration specifics in the global system of Life Science databases with open access.

Key words: databases, Life Science, collections of microorganisms

The current report presents VKM IBPM RAS results of the study of inner integration specifics in the global system of Life Science databases with open access.

The number of databases discovered is approximately 20 000, the number databases studied and collected in our Metabase - 2669.

Our main interest are the databases with microbial data, their interconnection was inspected in more detail: by the types of knowledge presented in them, by the partners databases, ontologies used, the methods of computer program access recommended by the databases producer.

We also inspected the fitness of this community to detail recommendations of European FAIR Expert group and present the issues.

The network of the database partners looks like LOD Cloud but is much bigger in size.

For acceleration of this research we make the data-mining scripts in Python, currently they inspected databases produced in EMBL-EBI, in NCBI, in ExPAZy list and in the KEGG group. The system constructed is practical, for 622 microorganisms in VKM database it collected up 59 external databases with additional information.

The study was reported in CORBEL project of European bio-medical system and recommended in EOSC-Life project (H2020) for the next steps of integration: interconnection of Life Science databases with the system of the microorganisms in Culture collections - in Work Packages 1, 2 and 6. Project will start in March, 2019.

Our research take specific care in practical areas: patent, health (mostly human), pharmacology, agriculture, etc. The practical results in bioremediation inside BRIO project of FP7 («BRIO - Belgian-Russian Initiative on Rio objectives. Set up of a network for banking rhizosphere micro – biodiversity») will be also reported.

УДК 03.01.09

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ПОЧТИ ИЗОГЕННОЙ ЛИНИИ ЯЧМЕНЯ С ЧАСТИЧНЫМ АЛЬБИНИЗМОМ

Шмаков Н.А., Глаголева А.Ю., Афонников Д.А., Хлёткина Е.К.

ФГБНУ ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН
 630090, Российская Федерация, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10
 e-mail: shmakov@bionet.nsc.ru

Был проведён анализ транскриптома растений ячменя почти изогенной линии i:BwAlm, отличающейся частичным альбинизмом. Была обнаружена дифференциальная экспрессия генов между линией i:BwAlm и изогенной линией Bowman, использованной в качестве контроля. Также, была проведена *de novo* сборка транскриптома исследуемой линии, и были обнаружены ранее не аннотированные гены ячменя.

Ключевые слова: транскриптомика, дифференциальная экспрессия генов, *de novo* сборка, ячмень, альбинизм

Хлорофилл – растительный пигмент, участвующий в фотосинтезе. Отсутствие хлорофилла в клетках растения вызывает альбинизм и приводит к преждевременной гибели организма из-за энергетического голода. Однако отмечены случаи частичного альбинизма, при котором растение может достичь репродуктивного возраста и оставить потомство. Изучение таких растений может пролить свет на особенности синтеза и распределения хлорофилла и функционирования хлоропластов. Перспективным объектом для изучения таких процессов является линия ячменя i:BwAlm, отличающаяся частичным альбинизмом.

Транскриптом – совокупность всех транскриптов биологического образца. Исследования транскриптома дают сведения об экспрессии генов в масштабе всего генома. RNA-seq – наиболее производительный метод исследования транскриптома. В данной работе метод RNA-seq был использован для секвенирования транскриптомов линии ячменя i:BwAlm и контрольной линии Bowman.

Сравнение транскриптомов двух линий выявило различия в экспрессии ряда генов, включая гены, локализованные в хлоропластном геноме. Были выявлены метаболические пути, включающие гены с разницей в экспрессии между двумя линиями. *De novo* сборка транскриптома позволила предсказать существование ранее не аннотированных генов ячменя, включая гены устойчивости к заболеваниям.

УДК 03.01.09

INVESTIGATING TRANSCRIPTOME OF BARLEY NEARLY ISOGENIC LINE WITH PARTIAL ALBINISM

Shmakov N.A., Glagoleva A.Y., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K.

630090, Russian Federation, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva 10
e-mail: shmakov@bionet.nsc.ru

Transcriptome of barley nearly isogenic line i:BwAlm with partial albinism was analyzed. Differential expression of genes between line i:BwAlm and control isogenic line Bowman was observed. Furthermore, *de novo* reconstruction of transcriptome was conducted, and previously unannotated genes of barley were discovered.

Key words: transcriptomics, differential expression of genes, *de novo* assembly, barley, albinism

Chlorophyll is a plant pigment participating in photosynthesis. Chlorophyll deficiency in plant cells causes albinism and leads to premature death due to energy starvation. However, instances of partial albinism are described, in which cases the plant can survive long enough to reproduce. Researching such organisms can shed light upon details of chlorophyll synthesis and distribution and chloroplast functioning. A promising object for such study is barley nearly isogenic line i:BwAlm defined by partial albinism.

Transcriptome is a sum of all transcripts in a biological sample. Researches of transcriptome provide information of gene expression on the scale of whole genome. RNA-seq is the most high throughput method of transcriptome investigation. In the present work, RNA-seq was implemented to sequence transcriptomes of barley lines i:BwAlm and Bowman.

Comparison of two lines' transcriptomes revealed discrepancies in expression of a number of genes, including genes localized in chloroplast genome. Metabolic pathways involving genes with differential expression between two lines were identified. *De novo* transcriptome assembly was performed, and existence of previously not annotated barley genes, including genes of disease resistance, was predicted.

УДК 577.21

КЛАСТЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ СУБТИПА HER2 РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Айсина Д.Е.

НИИ Проблем биологии и биотехнологии, КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан
050038, Алматы, Проспект аль-Фараби, д. 71, корп. 6
e-mail: dana.aisina03@gmail.com

В 5'UTR, CDS и 3'UTR установлены кластеры сайтов связывания miRNA в mRNA генов субтипа HER2. Ассоциации некоторых кандидатных генов и miRNA с повышенной свободной энергией взаимодействия могут служить основой для разработки методов диагностики субтипа HER2 рака молочной железы.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, HER2 субтип, рак молочной железы, кластер

Рак молочной железы занимает одно из первых мест среди всех раковых заболеваний в мире [1]. miRNA являются регуляторами экспрессии генов, участвующих в развитии рака молочной железы (РМЖ). В настоящей работе сайты связывания miRNA предсказывали программой MirTarget, которая определяет: а) начало инициации связывания miRNA с mRNA; б) локализацию сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA; в) свободную энергию гибридизации (ΔG , кДж/моль); и г) схемы взаимодействий нуклеотидов (нт) между miRNA и mRNA [2]. Нуклеотидные последовательности mRNA генов человека заимствованы из NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидные последовательности 2565 miRNA человека взяты из базы данных miRBase (<http://mirbase.org>), 3707 miRNA заимствованы из публикации [3]. Установлены сайты связывания miRNA с перекрывающимися нуклеотидными последовательностями (кластеры), расположенные в 5'UTR, CDS или 3'UTR mRNA многих генов. Кластерная организация сайтов связывания miRNA и свободная энергия взаимодействия miRNA с mRNA определяют конкуренцию между miRNA за

связывание с mRNA. Сайты связывания 23 miRNA были обнаружены в 5'UTR mRNA трех кандидатных генов EPOR, MAZ и NISCH субтипа HER2 рака молочной железы. mRNA гена EPOR имела три сайта связывания miRNA, образующих кластер из 26 нт, расположенный от 77 нт по 102 нт в 5'UTR mRNA EPOR гена. В mRNA MAZ гена сайты связывания TJU_CMC_MD2.ID00968.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01476.3p-miR, miR-1470 и TJU_CMC_MD2.ID00620.3p-miR были расположены в кластере длиной 34 нт, локализованном с 16 нт по 49 нт. Общая длина этих miRNA была равна 87 нт. Другой кластер в 5'UTR mRNA MAZ длиной 44 нт был образован сайтами связывания miR-6850-5p, miR-4466, miR-762, TJU_CMC_MD2.ID00915.3p-miR и TJU_CMC_MD2.ID02979.5p-miR. Оба кластера занимали всего 78 нт, а общая длина сайтов связывания девяти miRNA составляла 196 нт. Для 24 miRNA были установлены сайты связывания в CDS mRNA кандидатных генов. Ген MAPK3 был мишенью для трех miRNA, сайты связывания которых были расположены в кластере длиной 26 нт. mRNA гена MAZ имела сайты связывания для miRNA в четырех кластерах. В 3'UTR mRNA BRCA2 гена три сайта связывания miRNA составляли кластер. Сайты связывания девяти miRNA были обнаружены в 3'UTR mRNA гена CDK6. mRNA гена CDK6 имела сайты связывания для miRNA в двух кластерах. TJU_CMC_MD2.ID03264.3p-miR, miR-548h-3p, miR-548z, miR-548aq-3p, miR-548az-3p формировали кластер с 1677 нт по 1699 нт. mRNA генов BRCA2 и CDK6 имели сайты связывания для miRNA в 3'UTR со свободной энергией связывания от -98 кДж/моль до -117 кДж/моль. Таким образом, впервые обнаружена кластерная организация сайтов связывания miRNA с mRNA генов субтипа HER2 рака молочной железы. Выявлены количественные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов и на их основе предложены ассоциации для разработки методов диагностики рака молочной железы субтипа HER2.

Литература:

1. Benson, J.R., Jatoi, I. The global breast cancer burden // *Future Onco.* - 2012. - Vol. 8. - P. 697-702. doi: 10.2217/fon.12.61
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.
3. 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. doi: 10.1073/pnas.1420955112.

UDC 577.21

CLUSTER ORGANIZATION OF miRNA WITH mRNA GENES HER2 SUBTYPE BREAST CANCER

Aisina D.E.

Research Institute of Problems of Biology and Biotechnology, al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
 050038, Almaty, Prospect al-Farabi, 71, corp.6
 e-mail: dana.aisina03@gmail.com

Clusters of miRNA binding sites in mRNA genes of HER2 subtype have been established in 5'UTR, CDS and 3'UTR. Associations of several candidate genes and miRNA with increased free energy of interaction can serve as the basis for the development of diagnostic methods for HER2 subtype of breast cancer.

Key words: miRNA, mRNA, HER2 subtype, breast cancer, cluster

Breast cancer is one of the first places among all cancers in the world [1]. miRNAs are regulators of the expression of genes involved in the development of breast cancer (BC). In the present work, miRNA binding sites were predicted by the MirTarget program, which determines: a) the start of the initiation of miRNA binding to mRNAs; b) the localization of miRNA binding sites in 5'UTRs, CDSs and 3'UTRs of the mRNAs; c) the free energy of interaction miRNA and the mRNA (ΔG , kJ/mole); d) the schemes of nucleotide interactions between miRNAs and mRNAs [2]. The nucleotide sequences of mRNAs of human genes have been downloaded from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nucleotide sequences of human 2565 miRNAs have been downloaded from the miRBase database (<http://mirbase.org>), 3701 miRNAs nucleotide sequences have been taken from the publication [3]. The miRNA binding sites with overlapping nucleotide sequences (clusters) located in 5'UTR, CDS or 3'UTR mRNA of many genes have been established. The cluster organization of miRNA binding sites and the free energy of miRNA interaction with mRNA determine competition between miRNA for binding to mRNA. Binding sites of 23 miRNA

have been found in 5'UTR mRNA of three candidate genes EPOR, MAZ and NISCH of HER2 subtype of breast cancer. The mRNA EPOR gene had three miRNA binding sites forming a cluster of 26 nt, ranging from 77 nt to 102 nt in 5'UTR mRNA. In the mRNA of MAZ gene, the binding sites of TJU_CMC_MD2.ID00968.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID01476.3p-miR, TJU_CMC_MD2.ID00620.3p-miR, miR-1470 and have been located in a cluster with length of 34 nt from 16 nt to 49 nt. The total length of four miRNAs have been equal to 87 nt. Another cluster in MAZ mRNA with a length of 44 nt have been formed by miR-6850-5p, miR-4466, miR-762, TJU_CMC_MD2.ID00915.3p-miR and TJU_CMC_MD2.ID02979.5p-miR binding sites. Both clusters occupied only 78 nt, and the total length of binding sites of nine miRNAs was 196 nt. For 24 miRNA, binding sites have been established in CDS of mRNA candidate genes. MAPK3 gene have been a target of three miRNAs, the binding sites of which were located in a cluster with the length of 26 nt. The mRNA MAZ gene had binding sites for miRNA in four clusters. In 3'UTR mRNA of BRCA2 gene three miRNA binding sites constituted a cluster. Nine miRNA binding sites have been found in 3'UTR mRNA of CDK6 gene. mRNA of CDK6 gene had binding sites for miRNA in two clusters. miR-548h-3p, miR-548z, miR-548aq-3p, miR-548az-3p, TJU_CMC_MD2.ID03264.3p-miR formed a cluster from 1677 nt to 1699 nt. mRNAs of BRCA2 and CDK6 genes had binding sites for miRNA in 3'UTR with the free energy of binding from -98 kJ/mole to -117 kJ/mole. Thus, the cluster organization of miRNA binding sites to the mRNA genes of HER2 subtype of breast cancer have been first discovered. The quantitative characteristics of interaction of miRNA with mRNA candidate genes have been identified and associations on their basis have been proposed for the development of methods for diagnosing breast cancer subtype HER2.

References:

1. Benson, J.R., Jatoti, I. The global breast cancer burden // *Future Onco.* - 2012. - Vol. 8. - P. 697-702. doi: 10.2217/fon.12.61
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.
3. 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. doi: 10.1073/pnas.1420955112.

УДК 615.065

КОМПЬЮТЕРНАЯ ОЦЕНКА НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ

Иванов С.М., Лагунин А.А., Филимонов Д.А., Поройков В.В.

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

Разработан компьютерный подход к оценке нежелательных эффектов межлекарственных взаимодействий на сердечно-сосудистую систему, основанный на комплексном анализе спонтанных сообщений и связей «структура-активность». Подход был апробирован на примере следующих эффектов: инфаркт миокарда, ишемический инсульт, желудочковая тахикардия, артериальная гипертензия и сердечная недостаточность.

Ключевые слова: межлекарственные взаимодействия; нежелательные эффекты лекарств; сердечно-сосудистая система; спонтанные сообщения; взаимосвязь «структура-активность»

Нежелательные эффекты лекарственных средств (НЭЛ) являются одной из лидирующих причин смертности в развитых странах, а также основной причиной отзывов препаратов с рынка [1, 2]. НЭЛ, связанные с действием на сердечно-сосудистую систему, являются наиболее опасными и, в то же время, распространенными эффектами. Лечение заболеваний человека часто требует приема нескольких лекарств, что может приводить к межлекарственным взаимодействиям (МЛВ), вызывающим повышение частоты и выраженности нежелательных эффектов [3]. Оценка НЭЛ, включая оценку эффекта МЛВ на их проявление, является нетривиальной задачей и требует проведения большого количества экспериментальных и клинических исследований.

Для решения этой проблемы мы разработали компьютерный подход к оценке сердечно-сосудистых

эффектов МЛВ. Этот подход основан на анализе спонтанных сообщений из базы данных FDA [4] для идентификации МЛВ с последующим анализом связей «структура-активность» (ССА) для пар лекарственных соединений с целью предсказания пяти сердечно-сосудистых НЭЛ: инфаркт миокарда, ишемический инсульт, желудочковая тахикардия, сердечная недостаточность и артериальная гипертензия.

На первом этапе реализации подхода мы применили L1-регуляризованную логистическую регрессию к спонтанным сообщениям для идентификации пар лекарств, лежащих в основе МЛВ и вызывающих НЭЛ более часто, чем соответствующие лекарства по отдельности (примеры синергии и аддитивности, «активные» пары в моделях ССА) [5]. Используя похожий метод, мы также идентифицировали пары лекарств, которые не взаимодействуют друг с другом («неактивные» в моделях ССА).

На втором шаге реализации подхода, на основе полученных данных были построены пять моделей ССА. Для вычисления дескрипторов мы использовали оценки вероятности воздействия лекарственных соединений на 1553 белков-мишеней человека, полученных при помощи программы PASS Targets [6, 7]. Сумма и разность этих оценок были использованы в качестве дескрипторов для пар соединений. Соответствующие модели ССА были построены при помощи метода Random Forest. Оценки точности были вычислены при помощи процедуры пятикратного скользящего контроля.

Полученные выборки содержали в среднем 3100 пар лекарственных соединений с разным соотношением числа «активных» к числу «неактивных». Средняя площадь под ROC-кривой полученных моделей ССА составила 0.84, а средняя сбалансированная точность – 0.76. Предсказанные мишени лекарств, которые были использованы как дескрипторы, могут также служить основой для создания гипотез о механизмах индукции нежелательных эффектов пар соединений. Построенные модели ССА могут использоваться в клинике для отбора наиболее безопасных комбинаций лекарств.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-10168).

Литература:

1. Xu J., Murphy S. L., Kochanek K. D., Bastian B., Arias E. Deaths: Final Data for 2013 // *Natl. Vital Stat. Rep.* 2018. Vol. 67. № 5. P. 1–76.
2. Hornberg J. J., Laursen M., Brenden N., Persson M., Thougard A. V., Toft D. B., Mow T. Exploratory Toxicology as an Integrated Part of Drug Discovery. Part I: Why and How // *Drug Discovery Today*. 2014. Vol. 19. № 8. P. 1131–1136.
3. Fulton M. M., Allen E. R. Polypharmacy in the elderly: a literature review // *J. Am. Acad. Nurse Pract.* 2005. Vol. 17. № 4. P. 123–132.
4. Общедоступная часть базы данных FAERS
<https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Surveillance/AdverseDrugEffects/default.htm> (дата обращения: 15.08.2018).
5. Li Y., Zhang P., Sun Z., Hu J. Data-Driven Prediction of Beneficial Drug Combinations in Spontaneous Reporting Systems // *AMIA Annu. Symp. Proc.* 2017. Vol. 2016, P. 808–817.
6. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Rudik A. V., Druzhilovskii D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2014. Vol. 50. P. 444–457.
7. Pogodin P. V., Lagunin A. A., Filimonov D. A., Poroikov V. V. PASS Targets: Ligand-based multi-target computational system based on a public data and naïve Bayes approach // *SAR QSAR Environ. Res.* 2015. Vol. 26. № 10. P. 783–793.

УДК 615.065

COMPUTER ASSESSMENT OF CARDIOVASCULAR ADVERSE EFFECTS OF DRUG-DRUG INTERACTIONS

Ivanov S.M., Lagunin A.A., Filimonov D.A., Poroikov V.V.

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

Computational approach for the assessment of cardiovascular adverse effects of drug-drug interactions was developed. It is based on combined analysis of spontaneous reports and structure-activity relationships. Approach was applied to predict the following adverse effects: myocardial infarction, ischemic stroke, ventricular tachycardia, arterial hypertension and cardiac failure.

Key words: drug-drug interactions; adverse drug effects; cardiovascular system; spontaneous reports; structure-activity relationships

Adverse drug effects (ADEs) are one of the leading causes of death in developed countries and the main reason for drug recalls from the market [1, 2]. The ADEs associated with action on the cardiovascular system are the most dangerous and widespread. Treatment of human diseases often requires the intake of several drugs, which can lead to drug-drug interactions (DDIs) causing an increase in the frequency and severity of adverse effects [3]. Evaluation of ADEs, as well as the effect of DDIs on their manifestation, is a non-trivial task and requires numerous experimental and clinical studies.

To solve this problem, we developed a computational approach to assess the cardiovascular effects of DDIs. This approach is based on the analysis of FDA spontaneous reports (SRs) [4] to identify DDIs with subsequent creation of structure-activity relationships (SARs) for pairs of drugs to predict five cardiovascular ADEs: myocardial infarction, ischemic stroke, ventricular tachycardia, cardiac failure, and arterial hypertension.

At the first stage of our approach, we applied L1-regularized logistic regression to SRs for the identification of pairs of drugs that interact with each other and cause ADEs more frequently than individual drugs (examples of synergy and additivity, "actives" in SAR models) [5]. Using the same method we also identified pairs of drugs that do not interact with each other ("inactives" in SAR models).

At the second step, five SAR models were created based on the obtained information. We used probability estimates for 1553 human target calculated by PASS Targets software [6, 7] for each drug to create descriptors. Sum and difference of estimates were used as descriptors for drug pairs. To create SAR models we used Random Forest approach. Accuracy values were calculated based on 5-fold cross-validation procedure.

The obtained datasets include on average 3100 drug pairs with different active/inactive ratios. The average area under the ROC curve of obtained SAR models was 0.84, and the average balanced accuracy was 0.76. The predicted drug targets, which were taken as descriptors, can also be used to hypothesize the mechanisms of ADEs of DDIs. The created five SAR models can find practical application in the clinic for the selection of the safest combinations of drugs.

The study was supported by Russian Science Foundation grant 17-75-10168.

References:

1. Xu J., Murphy S. L., Kochanek K. D., Bastian B., Arias E. Deaths: Final Data for 2013 // *Natl. Vital Stat. Rep.* 2018. Vol. 67. № 5. P. 1–76.
2. Hornberg J. J., Laursen M., Brenden N., Persson M., Thougard A. V., Toft D. B., Mow T. Exploratory Toxicology as an Integrated Part of Drug Discovery. Part I: Why and How // *Drug Discovery Today*. 2014. Vol. 19. № 8. P. 1131–1136.
3. Fulton M. M., Allen E. R. Polypharmacy in the elderly: a literature review // *J. Am. Acad. Nurse Pract.* 2005. Vol. 17. № 4. P. 123–132.
4. Public part of the database FAERS
<https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Surveillance/AdverseDrugEffects/default.htm> (дата обращения: 15.08.2018).
5. Li Y., Zhang P., Sun Z., Hu J. Data-Driven Prediction of Beneficial Drug Combinations in Spontaneous Reporting Systems // *AMIA Annu. Symp. Proc.* 2017. Vol. 2016, P. 808–817.
6. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Rudik A. V., Druzhilovskii D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2014. Vol. 50. P. 444–457.
7. Pogodin P. V., Lagunin A. A., Filimonov D. A., Poroikov V. V. PASS Targets: Ligand-based multi-target computational system based on a public data and naïve Bayes approach // *SAR QSAR Environ. Res.* 2015. Vol. 26. № 10. P. 783–793.

УДК 575.852

ЛИНЕЙНЫЙ АЛГОРИТМ РЕКОНСТРУКЦИИ ХРОМОСОМНЫХ СТРУКТУР

Горбунов К.Ю., Любецкий В.А.

Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия, 127051, Москва, Б. Каретный пер., д. 19, стр. 1
e-mail: gorbunov@iitp.ru

Получен линейный по времени работы алгоритм построения наиболее экономного преобразования одной хромосомной структуры в другую. Алгоритм решает эту задачу в общем биологически мотивированном случае, который не рассматривался из-за его вычислительной трудности, и продолжает классические исследования в этой области.

Ключевые слова: хромосомная структура, хромосомная перестройка, линейной сложности алгоритм, оптимизация на графах

Получен новый линейный по времени работы и используемой памяти алгоритм решения давно и активно изучаемой задачи биоинформатики – реконструкция эволюции хромосомных структур. Среди родоначальников и ведущих учёных, которые поставили и изучали задачу, П.А. Певзнер и D. Sankoff, [1-3] и сотня последующих работ. Мы рассмотрели задачу в полной и биологически мотивированной постановке, в которой она не рассматривалась. А именно, структуры состоят из произвольного числа линейных и кольцевых хромосом, имеют неравный генный состав, допускаются все DCJ-операции над структурами, [4], и операции вставки, удаления участка хромосомы, каждой операции присвоена оценка частоты её биологической встречаемости, которая называется её ценой. Полученный нами алгоритм, в частности, по любым хромосомным структурам a и b , заданным в виде ориентированных графов, строит последовательность операций, преобразующую a в b , которая имеет минимальную суммарную стоимость операций. Если DCJ-операции имеют одинаковую цену c , а операции удаления и вставки – любые цены w_1 и w_2 , для которых $w_1 \geq c$, $w_2 \geq c$, то суммарная цена операций в последовательности, полученной алгоритмом, отличается от абсолютно минимальной не более, чем на $2c$. Если все хромосомы кольцевые, то алгоритм выдаёт в точности минимальную последовательность операций.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-29-13037).

Литература:

1. Sankoff D., Leduc G., Antoine N., Paquin B., Lang B.F., Cedergren R. Gene order comparisons for phylogenetic inference: evolution of mitochondrial genome // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1992. — V. 89. — P. 6575-6579.
2. Hannenhalli S., Pevzner P. Transforming cabbage into turnip: polynomial algorithm for sorting signed permutations by reversals // *J. of the ACM.* — 1999. — V. 46. — P. 1-27.
3. Alekseyev M.A., Pevzner P.A. Multi-Break Rearrangements and Chromosomal Evolution // *Theor. Comput. Sci.* — 2008. — V. 395. — № 2-3. P. 193-202.
4. Bergeron A., Mixtacki J., Stoye J. A unifying view of genome rearrangements // in *Proc. of 6th International Workshop on Algorithms in Bioinformatics, Zurich, Switzerland, Sept. 8–10, 2006, Lect. Notes Bioinform.* — 2006. — V. 4175. — P. 163-173.

UDC 575.852

LINEAR ALGORITHM FOR RECONSTRUCTION OF CHROMOSOME STRUCTURES

Gorbunov K.Yu., Lyubetsky V.A.

*Institute for Information Transmission Problems (Kharkevich Institute), RAS,
 Bolshoy Karetny per. 19, build.1, Moscow 127051 Russia
 e-mail: gorbunov@iitp.ru*

We obtain a linear time algorithm for constructing a minimal-cost transformation of one chromosome structure into another. The algorithm solves this problem in the general biologically motivated case, which has not been previously considered because of its computational complexity, and continues classical studies in this area.

Key words: chromosome structure, chromosome rearrangement, linear complexity algorithm, optimization in graphs

We have obtained a new linear time and linear space algorithm for solving a long-standing and actively studied problem in bioinformatics, reconstruction of evolution of chromosome structures. Among the founders and leading scientists who have posed and investigated the problem we should mention P.A. Pevzner and D. Sankoff, [1-3], and a hundred of subsequent works. We have studied the problem in its complete and biologically motivated setting, which has not been considered before. Namely, structures consist of arbitrarily many linear and cyclic chromosomes and have unequal gene content; admissible operations are all DCJ operations over structures, [4], and insertions/deletions of chromosome fragments; each operation is assigned with a frequency estimate of its biological occurrence, referred to as its cost. The obtained algorithm, in particular, given any chromosome structures a and b represented as directed graphs, constructs a sequence of operations transforming a into b with the minimum total cost of operations. If the DCJ operations have the same cost c and insertions and deletions have any costs w_1 and w_2 with $w_1 \geq c$ and $w_2 \geq c$, then the total cost of operations in the sequence constructed by the algorithm differs from the absolute minimum by at most $2c$. If all chromosomes are cyclic, then the algorithm outputs precisely the minimum sequence of operations.

The research is supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 18-29-13037).

References:

1. Sankoff D., Leduc G., Antoine N., Paquin B., Lang B.F., Cedergren R. Gene order comparisons for phylogenetic inference: evolution of mitochondrial genome // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1992. — V. 89. — P. 6575-6579.
2. Hannenhalli S., Pevzner P. Transforming cabbage into turnip: polynomial algorithm for sorting signed permutations by reversals // *J. of the ACM.* — 1999. — V. 46. — P. 1-27.
3. Alekseyev M.A., Pevzner P.A. Multi-Break Rearrangements and Chromosomal Evolution // *Theor. Comput. Sci.* — 2008. — V. 395. — № 2-3. P. 193-202.
4. Bergeron A., Mixtacki J., Stoye J. A unifying view of genome rearrangements // in *Proc. of 6th International Workshop on Algorithms in Bioinformatics, Zurich, Switzerland, Sept. 8–10, 2006, Lect. Notes Bioinform.* — 2006. — V. 4175. — P. 163-173.

УДК 616.34-008

МАШИННОЕ ОБУЧЕНИЕ В АНАЛИЗЕ МИКРОБИОТЫ: МЕЖИНДИВИДУАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОТВЕТА НА ИЗМЕНЕНИЕ ДИЕТЫ

Клименко Н.С., Попенко А.С., Алексеев Д.Г., Тяхт А.В.

ООО «Кномикс»

121205, г. Москва, тер. Сколково инновационного центра, ул. Большой бульвар, д. 42, стр. 1, пом. 1293, 1294, 1295, 1296.

e-mail: natasha.klmnk@gmail.com

Была проанализирована межиндивидуальная вариабельность изменения состава микробиоты кишечника в ответ на прием продуктов с пробиотиками и с высоким содержанием клетчатки.

Ключевые слова: кишечная микробиота, машинное обучение, модуляция состава микробиоты

Микробиота кишечника человека играет важную роль в поддержании многих функций организма человека. Смещение ее таксономического и функционального состава, оцененное с помощью метагеномных технологий, ассоциировано с рядом заболеваний, в том числе с воспалительными заболеваниями кишечника, метаболическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Модуляция состава кишечного сообщества с помощью изменения диеты, приема пребиотиков и пробиотиков – многообещающий подход к профилактике, диагностике и терапии заболеваний. Известно, что изменения состава микробиоты в ответ на одну и ту же интервенцию широко варьируют между людьми. В данном исследовании были сопоставлены изменения кишечного метагенома волонтеров при двух диетических вмешательствах: повышении приема продуктов, богатых пищевыми волокнами, и употреблении кисломолочного продукта с пробиотическими бактериями. В обеих когортах степень ответа состава микробиоты на интервенцию существенно варьировала между добровольцами. Микробиота индивидов с большей степенью ответа (респондеров, англ. responders) характеризовалась повышенной представленностью кишечных бактерий-генералистов из рода *Bacteroides* и сниженной представленностью бактерий-специалистов из отдела *Firmicutes*. Был построен машинный классификатор, позволяющий с довольно высокой точностью определять реакцию состава микробиоты индивида на интервенцию исходя из изначального состава (алгоритм Random Forest, AUC > 0.7). Накопление и валидация базы знаний по ответу микробиоты на широкий спектр диетических интервенций позволит сформировать солидный базис для повышения эффективности персонализированных рекомендаций по диете и образу жизни.

Литература:

1. Klimenko, N.S., Tyakht, A.V., Popenko, A.S., Vasiliev, A.S., Altukhov, I.A., Ischenko, D.S., Shashkova, T.I., Efimova, D.A., Nikogosov, D.A., Osipenko, D.A. and Musienko, S.V. Microbiome Responses to an Uncontrolled Short-Term Diet Intervention in the Frame of the Citizen Science Project//*Nutrients* 2018. Vol 10. № 576.
2. Efimova, D., Tyakht, A., Popenko, A., Vasilyev, A., Altukhov, I., Dovidchenko, N., Odintsova, V., Klimenko, N., Loshkarev, R., Pashkova, M. and Elizarova, A. Knomics-Biota-a system for exploratory analysis of human gut microbiota data//*BioData mining* 2018. № 11. P. 25.
3. Volokh, O., Tyakht, A., Berezhnaya, Y., Nesterova, P. and St. Peter, J.V. Human Gut Microbiome Response Induced by Fermented Dairy Product Intake//*The FASEB Journal*. 2017. № 3. P. 965.
4. Griffin, N.W., Ahern, P.P., Cheng, J., Heath, A.C., Ilkayeva, O., Newgard, C.B., Fontana, L. and Gordon, J.I. Prior dietary practices and connections to a human gut microbial metacommunity alter responses to diet interventions//*Cell host & microbe* 2017. № 21, P. 84.

5. Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.M., Kennedy, S. and Leonard, P. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers//*Nature* 2013. № 500. P. 541.
6. Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N. and Gougis, S. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness//*Nature* 2013, № 500. P. 585.

УДК 616.34-008

MACHINE LEARNING FOR MICROBIOTA ANALYSIS: INTERINDIVIDUAL VARIABILITY OF THE RESPONSE TO DIETARY INTERVENTION

Klimenko N. S., Popenko A. S., Alexeev D. G., Tyakht A. V.

Knomics LLC

143026, Moscow, Skolkovo Innovation Center, Bolshoy bulvar street 42-1, rooms 1293, 1294, 1295, 1296.

e-mail: natasha.klmnk@gmail.com

Interindividual variability of the gut microbiota response to the intake of probiotic and high-fiber food products was analyzed.

Key words: gut microbiota, machine learning, microbiota modulation

The human intestinal microbiota plays an important role in maintaining many functions of the human body. Alterations in microbiota taxonomic and functional compositions evaluated using metagenomics has been linked to a number of pathologies including inflammatory bowel diseases, metabolic and cardiovascular diseases. Modulation of the gut community composition by dietary changes, as well as prebiotics and probiotics intake is a promising approach to the prevention, diagnosis and treatment of diseases. It is known that shifts in microbiota composition due to the same intervention can widely vary between subjects. In this study, changes in the intestinal metagenome of volunteers after two different interventions were compared: an increase in the intake of foods rich in dietary fiber and the use of a fermented dairy product with probiotic bacteria. In each cohort, the degree of the microbiota response to intervention varied significantly between volunteers. The microbiota of individuals with a greater degree of response (responders) was characterized by an increased abundance of intestinal bacteria-generalists from *Bacteroides* genus and a reduced abundance of bacteria-specialists from Firmicutes phylum. We constructed a machine learning classifier was built that allowed to predict the reaction of an individual microbiota to the intervention on the basis of the baseline composition with quite high accuracy (Random Forest algorithm, AUC > 0.7). Accumulation and validation of the data on the microbiota response to a wide range of dietary interventions will help to establish a knowledge base for increasing the efficacy of personalized dietary recommendations and lifestyle.

References:

1. Klimenko, N.S., Tyakht, A.V., Popenko, A.S., Vasiliev, A.S., Altukhov, I.A., Ischenko, D.S., Shashkova, T.I., Efimova, D.A., Nikogosov, D.A., Osipenko, D.A. and Musienko, S.V. Microbiome Responses to an Uncontrolled Short-Term Diet Intervention in the Frame of the Citizen Science Project//*Nutrients* 2018.Vol 10. № 576.
2. Efimova, D., Tyakht, A., Popenko, A., Vasilyev, A., Altukhov, I., Dovidchenko, N., Odintsova, V., Klimenko, N., Loshkarev, R., Pashkova, M. and Elizarova, A. Knomics-Biota-a system for exploratory analysis of human gut microbiota data//*BioData mining* 2018. № 11. P. 25.
3. Volokh, O., Tyakht, A., Berezhnaya, Y., Nesterova, P. and St. Peter, J.V.Human Gut Microbiome Response Induced by Fermented Dairy Product Intake//*The FASEB Journal*. 2017. № 3. P. 965.
4. Griffin, N.W., Ahern, P.P., Cheng, J., Heath, A.C., Ilkayeva, O., Newgard, C.B., Fontana, L. and Gordon, J.I. Prior dietary practices and connections to a human gut microbial metacommunity alter responses to diet interventions//*Cell host & microbe* 2017. № 21, P. 84.
5. Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.M., Kennedy, S. and Leonard, P. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers//*Nature* 2013. № 500. P. 541.
6. Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N. and Gougis, S. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness//*Nature* 2013, № 500. P. 585.

УДК 004.93

МЕТОД МОРФОМЕТРИИ КОЛОСА ПШЕНИЦЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ

Комышев Е.Г., Генаев М.А., Афонников Д.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, Россия

630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10

e-mail: komyshhev@bionet.nsc.ru

Разработан метод распознавания и морфометрии колоса пшеницы на цифровых изображениях. Предложенный подход показал высокую точность для определения качественных и количественных характеристик растений. Результаты анализа изображений загружены в систему для аннотаций морфометрических характеристик колоса пшеницы SpikeDroidDB.

Ключевые слова: анализ изображений, распознавание образов, морфометрия колоса, пшеница, базы данных

Форма и структура колоса – одни из важнейших характеристик злаков, связанные с такими их хозяйственно ценными качествами, как продуктивность, отсутствие ломкости колоса и легкость обмолота. Изучение генов, контролирующих данные признаки, позволит целенаправленно создавать новые сорта с улучшенными характеристиками по урожайности, легкости обмолота и устойчивостью к факторам внешней среды (Konopatskaia I.D. et al., 2016).

Оценка характеристик колоса в большинстве современных исследований выполняется экспертом на основании визуального анализа колоса и измерительных практик, что требует существенных затрат времени, при том, что в современных экспериментах проводится анализ десятков тысяч растений. Автоматизация этого трудоемкого и затратного по времени процесса за счет внедрения технологий анализа цифровых изображений является актуальной для современной науки.

В данной работе мы предлагаем метод распознавания колоса пшеницы, основанный на анализе цифровых изображений. Данный метод позволяет извлечь ряд признаков колоса, такие как длина, ширина, проецируемая на изображение площадь, цвет, остистость и т.д. Предложенный подход позволяет анализировать форму колоса, что является важной характерной чертой, тесно связанной с видовой принадлежностью растения, что в свою очередь может быть использовано для идентификации сортов. В рамках данной работы были проанализированы 1454 изображения 382 растений. Полученные морфометрические данные были загружены в базу данных SpikeDroidDB (Генаев М.А. и др., 2018, <http://spikedroid.biores.cytogen.ru>). Метод показал высокую точность для определения качественных и количественных характеристик колоса пшеницы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект 17-74-10148.

Литература:

1. Konopatskaia I.D., Vavilova V.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Spike morphology genes in wheat species (*Triticum L.*) // *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.* – De Gruyter Open, 2016. – Т. 70. – №. 6. – С. 345-355. doi: 10.1515/prolas-2016-0053
2. Генаев М.А., Комышев Е.Г., Фу Хао, Коваль В.С., Гончаров Н.П., Афонников Д.А. SpikeDroidDB – Информационная система для аннотации морфометрических характеристик колоса пшеницы // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2018. – Т. 22. – №. 1. – С. 132-140.

UDC 004.93

THE METHOD OF WHEAT SPIKE MORPHOMETRY BASED ON IMAGE ANALYSIS

Komyshchev E.G., Genaev M.A., Afonnikov D.A.

*Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences" (ICG SB RAS), Novosibirsk, Russia
 630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10
 e-mail: komyshchev@bionet.nsc.ru*

The method for recognition and morphometry of the wheat spike on digital images has been developed. The proposed approach showed high accuracy for determining the qualitative and quantitative characteristics of plants. Image analysis results are loaded into an information system for annotation of morphometric characteristics of wheat spike SpikeDroidDB.

Ключевые слова: image analysis, pattern recognition, spike morphometry, wheat, data bases

The shape and structure of the wheat spike is one of the most important characteristics of cereals, associated with their economically valuable qualities such as productivity, the absence of ear fragility and free threshing. The study of the genes controlling these traits will allow breeders to purposefully create new varieties with improved characteristics in terms of yield, ease of thresh and resistance to environmental factors (Konopatskaia I.D. et al., 2016).

Evaluation of the spike characteristics in modern studies is performed by an expert based on a visual analysis of the spike and measuring practices, which requires a significant investment of time, despite the fact that in modern experiments tens of thousands of plants are analyzed. Automation of this time-consuming process through the introduction of digital image analysis technologies is relevant to modern science.

We propose the method of wheat spike morphometry, based on the analysis of digital images. This method allows you to extract a number of spike features, such as the spike length, width, area projected on the image, color, awns volume, etc. The proposed approach allows us to analyze the spike shape, which is an important characteristic that is closely related to the species of the plant, which in turn can be used to identify varieties. In this work 1454 images of 382 plants have been analyzed. The obtained morphometric data were loaded into the SpikeDroidDB database (Genaev M.A. et al., 2018, <http://spikedroid.biores.cytogen.ru>). The proposed approach has shown high accuracy for determining the qualitative and quantitative characteristics of wheat spike.

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 17-74-10148.

References:

1. Konopatskaia I.D., Vavilova V.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Spike morphology genes in wheat species (*Triticum L.*) // *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences. – De Gruyter Open*, 2016. – T. 70. – №. 6. – С. 345-355. doi: 10.1515/prolas-2016-0053
2. Genaev M.A., Komyshchev E.G., Fu Hao, Koval V.S., Goncharov N.P., Afonnikov D.A. SpikeDroidDB: an information system for annotation of morphometric characteristics of wheat spike // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2018. – T. 22. – №. 1. – С. 132-140. DOI 10.18699/VJ18.340 (in Russian)

УДК 577.21

МОДЕЛИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ, ПОСТРОЕННЫЕ НА ИНФОРМАЦИИ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ И СТРУКТУРЕ, ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ СТРУКТУР СТЕБЕЛЬ-ПЕТЛЯ НА 3'-КОНЦАХ ТРАНСПОЗОНОВ L1 И ALU В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА

А. Заикин, А. Шеин, М. Попцова

Лаборатория биоинформатики, Департамент больших данных и информационного поиска, Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, Москва, Россия
125319, Москва, Кочновский проезд, 3
e-mail: mpoptsova@hse.ru; avzaikin@hse.ru; avshein@edu.hse.ru

Мы построили и исследовали два типа моделей, основанных на информации о последовательностях и структурных свойствах, для распознавания структур типа стебель-петля на 3'-концах L1 и Alu человека, и обнаружили параметры, дающие наибольший вклад в распознавание: Shift, Tilt, Rise и гидрофильность.

Ключевые слова: транспозоны, L1, Alu, стебель-петля, машинное обучение, случайный лес

Как белки LINE распознают свою собственную РНК и РНК SINE остается до сих пор неизвестным [1]. Для некоторых видов экспериментально показано, что белки LINE распознают вторичные структуры, такие как стебель-петля на 3'-конце РНК транспозона. Более того, показано наличие идентичных структур типа стебель-петля на 3'-концах последовательностей LINE и SINE для некоторых организмов, при этом структуры являются значимыми для распознавания белками транспозонов [2-4]. Мы обнаружили консервативную вторичную структуру на 3'-конце для L1 (LINE) и Alu (SINE) человека [5], а также и для других видов дерева жизни (неопубликованные результаты). При отсутствии схожести на уровне последовательностей, консервативное расположение этой структуры предполагает ее функциональность.

В настоящей работе мы исследовали структурные свойства 3'-конца L1 и Alu структур стебель-петля посредством моделей машинного обучения. Мы построили два типа моделей, используя два различных набора признаков: взятых из информации о последовательностях и из информации о структуре. Для модели, основанной на последовательностях, мы использовали частоты ди- и три-нуклеотидов, подсчитывая включения для каждого k-мера с шагом 1 вдоль последовательности. Для структурной модели мы рассматривали ножку, петлю и внутреннюю петлю ножки. Для ножки мы брали динуклеотидные свойства РНК из базы данных DiProDB [6], содержащей значения структурных параметров Shift, Slide, Rise, Tilt, Roll, Twist, а также физических и химических характеристик, таких как энтальпия, энтропия и гидрофильность. Мы построили модель Случайного Леса на 2000 деревьях с помощью библиотеки sklearn. Реализация модели и все данные для анализа доступны на github: <https://github.com/AlexShein/transposons/>.

Качество обеих моделей согласно метрике AUC варьирует в диапазоне 95-99%. Однако структурная модель позволяет извлекать важные структурные свойства. Анализ важности признаков структурной модели показал структурно-значимые характеристики для структуры стебель-петля из нескольких групп. Так оказалось, что параметры Shift, Rise и Tilt оказывают наибольший вклад в распознавание L1 и Alu 3'-структур. В дополнении к этому, ближайшие к петле нуклеотиды оказались более важными для распознавания Alu. Полученные результаты ясно демонстрируют наличие структурных ограничений для 3'-структур L1 и Alu, которые предположительно играют важную роль в распознавании пары L1-Alu машинерией L1. Сконструированные модели машинного обучения могут быть использованы для de novo обнаружения структур, относящихся к транспозонам.

Литература:

1. Richardson, S.R., et al., The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr*, 2015. 3(2): p. MDNA3-0061-2014.
2. Hayashi, Y., et al., Mechanism by which a LINE protein recognizes its 3' tail RNA. *Nucleic Acids Research*, 2014. 42(16): p. 10605-10617.
3. Kajikawa, M. and N. Okada, LINEs Mobilize SINEs in the Eel through a Shared 3' Sequence. *Cell*, 2002. 111(3): p. 433-444.
4. Osanai, M., et al., Essential motifs in the 3' untranslated region required for retrotransposition and the precise start of reverse transcription in non-long-terminal-repeat retrotransposon SART1. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(18): p. 7902-13.
5. Grechishnikova, D. and M. Poptsova, Conserved 3' UTR stem-loop structure in L1 and Alu transposons in human genome: possible role in retrotransposition. *BMC Genomics*, 2016. 17(1): p. 992.
6. Friedel, M., et al., DiProDB: a database for dinucleotide properties. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Database issue): p. D37-40.

UDC 577.21

SEQUENCE-BASED AND STRUCTURE-BASED MACHINE-LEARNING MODELS FOR RECOGNITION OF 3'-END L1 AND ALU STEM-LOOPS IN HUMAN GENOME

A. Zaikin, A. Shein, M. Poptsova

Laboratory of Bioinformatics, Big Data and Information Retrieval School, Faculty of Computer Science, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia
 125319, Moscow, Kochnovsky proezd, 3
 e-mail: mpoptsova@hse.ru

We built and evaluated two types of models: sequence-based and structure-based for recognition of 3'-end stem-loops of human L1s and Alus and found most important parameters contributing to recognition: Shift, Tilt and Rise, and also hydrophilicity.

Key words: transposons, L1, Alu, stem-loop, machine-learning, Random Forest

How LINE proteins recognize their own and SINE RNA remains unclear [1]. For several species it was experimentally shown that the LINE protein recognizes a secondary structure, such as a stem-loop, at the 3'-end of a transposon RNA. Moreover it was shown that in some organisms LINEs and SINEs have identical 3'-end sequences containing a stem-loop structure, which is essential for transposon RNA recognition by transposon proteins [2-4]. We discovered a conservative secondary structure at the 3'-end of human L1 (LINE) and Alu (SINE) transposons [5], as well as in different species across the tree of life (unpublished results). Despite the absence of similarity at the level of sequences, conservative position of this structure suggests its functionality.

In the present study we explored structural properties of 3'-end L1 and Alu stem-loops with machine-learning models. We built two types of models using two different types of features: sequence-based and structure-based. For sequence-based model we took frequencies of di- and trinucleotides counting occurrences of each k-mer moving with the 1 bp step along the sequence. For structure-based models we considered a stem, a loop, and a bulge. For stem we took RNA dinucleotide properties from DiProDb [6], which include structural parameters Shift, Slide, Rise, Tilt, Roll, Twist and physical and chemical properties such as enthalpy, entropy, free energy, and hydrophilicity.

We built Random Forest models with 2000 trees using scikit-learn library. The model implementation and all data analysis is available at github: <https://github.com/AlexShein/transposons/>.

The performance for two types of models are high with AUC in a range of 95-99%. However structure-based models allows extracting important structural properties.

The feature importance analysis of the structure-based model revealed structurally important characteristics in stem-loop structures of different groups of elements. Thus the parameter Shift followed by Rise and Tilt appeared to be more influential for recognizing the joint set of L1 and Alu stem-loops while Shift was shown to be more important for recognizing L1 3'-UTR stem-loops and Rise is more important for distinguishing between L1 and Alu 3'-end stem-loops. Additionally, the parameters of stem positions adjacent to the loop appeared to be more important for Alu recognition. The obtained results clearly demonstrate the existence of structural constraints for 3'-end stem-loops of L1 and Alu, which presumably play an important role in recognition of L1-Alu pairs by the L1 machinery. The constructed machine-learning models can be used for de novo discovery of transposon-related stem-loops.

References:

1. Richardson, S.R., et al., *The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes*. *Microbiol Spectr*, 2015. 3(2): p. MDNA3-0061-2014.
2. Hayashi, Y., et al., *Mechanism by which a LINE protein recognizes its 3' tail RNA*. *Nucleic Acids Research*, 2014. 42(16): p. 10605-10617.
3. Kajikawa, M. and N. Okada, *LINEs Mobilize SINEs in the Eel through a Shared 3' Sequence*. *Cell*, 2002. 111(3): p. 433-444.
4. Osanai, M., et al., *Essential motifs in the 3' untranslated region required for retrotransposition and the precise start of reverse transcription in non-long-terminal-repeat retrotransposon SART1*. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(18): p. 7902-13.
5. Grechishnikova, D. and M. Poptsova, *Conserved 3' UTR stem-loop structure in L1 and Alu transposons in human genome: possible role in retrotransposition*. *BMC Genomics*, 2016. 17(1): p. 992.
6. Friedel, M., et al., *DiProDB: a database for dinucleotide properties*. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Database issue): p. D37-40.

УДК 573.22

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ПРОКАРИОТ В ПРОСТРАНСТВЕННО-ГЕТЕРОГЕННЫХ СРЕДАХ БЕЗ И ПРИ ФАГОВОЙ ИНФЕКЦИИ.

Матушкин Ю.Г., Клименко А.И., Мустафин З.С., Лашин С.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 10
e-mail: mat@bionet.nsc.ru

Построены и исследованы компьютерные модели эволюции и функционирования системы «фаг – микробное сообщество» в проточной пространственно-распределённой среде. Показано, что фаговая инфекция снижает скорость появления новых видов в системе более чем на порядок, в зависимости от времени и пространственной локализации начального заражения сообщества, а также от способности клеток к хемотаксису.

Ключевые слова: микробное сообщество, хемотаксис, фаги, экологическое моделирование, эволюционное моделирование.

Среди бактерий различных микробных сообществ существуют два противоположных эволюционных тренда – направленных на усложнение и на упрощение метаболизма. Как экосистемные ограничения, так и особенности генных сетей, лежащих в основе соответствующих метаболических процессов, выступают в качестве факторов, определяющих эволюционный исход в сообществе. Мы теоретически показали, что в пространственно-структурированных средах, характеризующихся наличием субстратных градиентов, возможно пространственное подразделение различных эволюционных тенденций в зависимости от близости ячейки к притоку питательных веществ, однако, эта закономерность разительно меняется для клеток, способных к активному движению в направлении хемотактанта. Показано, что процессы горизонтального переноса и потери генов в сообществах подвижных прокариот могут приводить к стабильному распределению биомасс экогрупп, отличному от того, которое наблюдается в ходе естественного отбора в сообществе с полным набором комбинаций метаболических систем. Моделирование показало, что экологические паттерны самоорганизации микробных сообществ способствуют поддержанию различных стратегий, лежащих в основе сценариев, как усложнения, так и упрощения метаболизма. Таким образом, различные эволюционные тренды поддерживаются в средах с контрастными условиями, что обуславливается пространственной структурой местообитания.

Бактериофаги считаются одной из движущих сил бактериальной эволюции, поскольку способствуют горизонтальному переносу генов, а также выступают в роли одного из факторов отбора. Однако влияние фагов на эволюцию метаболических систем микробов остаётся мало изученным, особенно в контексте сложной трофической структуры микробного сообщества. Мы построили и проанализировали серию компьютерных моделей микробных сообществ, эволюционирующих в пространственно-неоднородных средах под воздействием фаговой инфекции. Для моделирования использовался программный комплекс ГЭК 3D (<http://evol-constructor.bionet.nsc.ru/>), позволяющий рассматривать в рамках одной модели генетический, метаболический, клеточный, популяционный и экологический уровни биологической организации. Рассматривались проточные жидкие среды с градиентом субстратов. Варьировалось время и пространственная локализация начального заражения системы, а также способность клеток к хемотаксису. Было показано, что варьирование пространственной локализации инвазии фагов в микробное сообщество приводит к изменению эволюционных сценариев, реализующихся в сообществе [1].

Данная работа была выполнена при поддержке бюджетного проекта № 0324-2019-0040.

Литература:

1. Klimenko A.I., Matushkin Y.G., Kolchanov N.A., Lashin S.A. Bacteriophages affect evolution of bacterial communities in spatially distributed habitats: a simulation study // *BMC Microbiology*. 2016. Vol.16. № 10. (Suppl 1):10. DOI: 10.1186/s12866-015-0620-4

UDC 573.22

MODELING THE EVOLUTION OF METABOLISM OF PROKARYOTES IN SPATIALLY HETEROGENEOUS ENVIRONMENTS, WITH AND WITHOUT PHAGE INFECTION.

Matushkin Yu.G., Klimenko A.I., Mustafin Z.S., Lashin S.A.

*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
 630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave. 10
 e-mail: mat@bionet.nsc.ru*

Computer models of evolution and functioning of the “phage – microbial community” system in a spatially distributed habitat were simulated and analyzed. Phage infection was shown to reduce the rate of speciation in a system depending on time and spatial localization of initial infestation as well as on the chemotactic ability of cells.

Key words: microbial community, chemotaxis, phages, ecological modeling, evolutionary modeling.

There are two evolutionary trends in genome organization among bacteria inhabiting microbial communities – towards amplification and towards reduction of metabolism. Both environmental constraints and the complexity of underlying gene network apparently act as factors determining evolutionary fate of a community. Here, we have theoretically shown that spatially structured habitats characterized by nutrient gradients allow subdivision of evolutionary trends depending on the distance of a sub-habitat to the nutrient source though this pattern changes drastically if cells are able to move actively towards chemo attractant. We have demonstrated that horizontal gene transfer and gene loss occurring in the communities of motile bacteria are able to produce robust biomass dynamics of the ecogroups, which differs from the dynamics in the model of a community that consists of populations possessing all feasible metabolic combinations under natural selection. Simulations have shown that ecological patterns of self-organization of microbial communities cause sustainability of different strategies underlying the antagonistic evolutionary scenarios. Different evolutionary trends sustain in habitats with contrasting ecological conditions due to nutrient gradients that structure the environment spatially.

Bacteriophages are the one of the driving forces of bacterial evolution, as they promote horizontal transfer of genes as well as they act as a directional selection factor. However, the impact of phages on metabolic evolution especially in the context of trophic structure of a microbial community remains obscure. We have built and analyzed a series of computer models of microbial communities evolving in spatially non-uniform habitats under the influence of phage infection. We used HEC 3D software (<http://evol-constructor.bionet.nsc.ru/>) to perform simulations. The HEC 3D considers genetic, metabolic, cellular, population and ecological levels of biological organization within the framework of one model. We modeled spatially distributed aquatic habitats characterized by nutrient gradients. We varied time and spatial localization of initial infestation as well as the chemotactic ability of cells. It has been shown that varying spatial localization of initial phage invasion leads to the change of evolutionary scenarios manifesting in a community [1].

This work was supported by the budget project № 0324-2019-0040.

References:

1. Klimenko A.I., Matushkin Y.G., Kolchanov N.A., Lashin S.A. Bacteriophages affect evolution of bacterial communities in spatially distributed habitats: a simulation study // *BMC Microbiology*. 2016. Vol.16. № 10. (Suppl 1):10. DOI: 10.1186/s12866-015-0620-4

УДК 615.015.11:577.29:004.032.26:616.379-008.64

НЕЙРОСЕТЕВАЯ МОДЕЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ RAGE-NF-KB

Васильев П.М., Спасов А.А., Яналиева Л.Р., Кочетков А.Н., Ворфоломеева В.В., Клочков В.Г., Аппазова Д.Т.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия
400130, Волгоград, пл. Павших борцов, д. 1
e-mail: pvassiliev@mail.ru

Методами докинга и искусственных нейронных сетей построена модель сигнального пути RAGE-NF-kB, связывающая RAGE-ингибирующую активность химических соединений с их аффинностью в отношении 22 релевантных белков-мишеней.

Ключевые слова: ингибиторы RAGE; белки-мишени; докинг; искусственные нейронные сети; модель сигнального пути RAGE-NF-kB.

Для сигнального пути RAGE-NF-kB человека выявлены 14 основных узлов и найдены 78 видов монофункциональных белков, субъединиц и изоформ биомишеней этого сигналинга. В результате текст-майнинга из 78 белков выделено 34 релевантных биомишени, найдены 826 их 3D-моделей. Из этих 34 белков-мишеней после верификации отобрано 22 биомишени, для которых выявлено 66 валидных 3D-моделей. Методами молекулярной механики и квантовой химии построены 3D-модели 183 известных RAGE-ингибиторов. С помощью программы AutoDock Vina выполнен ансамблевый докинг этих соединений в сайты 66 3D-моделей 22 валидных белков-мишеней, определены минимальные энергии докинга ΔE . Сформирована обучающая выборка по уровню активности и аффинности 183 известных RAGE-ингибиторов в отношении 22 белков-мишеней сигнального пути RAGE-NF-kB, включающая 4026 значений ΔE . По методике искусственных многослойных перцептронных нейронных сетей с архитектурой «узкого горла» с помощью программы Statistica Neural Networks построена модель сигнального пути RAGE-NF-kB. Методом ROCK-анализа выполнена оценка точности полученной модели, которая для высокого уровня RAGE-ингибирующей активности составила 90% ($p < 0.001$). Модель позволяет прогнозировать экспериментальный уровень RAGE-ингибирующей активности химических соединений по расчетным показателям их аффинности к 22 белкам-мишеням сигнального пути RAGE-NF-kB. Полученная модель будет использована для направленного поиска высокоактивных системных полифункциональных мультитаргетных RAGE-ингибиторов для лечения патий при сахарном диабете и болезни Альцгеймера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-015-00499).

UDC 615.015.11: 577.29: 004.032.26: 616.379-008.64

NEURAL NETWORK MODEL OF THE RAGE-NF-KB SIGNALING PATHWAY

Vassiliev P.M., Spasov A.A., Yanaliev L.R., Kochetkov A.N., Vorfolomeeva V.V., Klochkov V.G., Appazova D.T.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia
400130, Volgograd, Pavshikh bortsov sq., 1
e-mail: pvassiliev@mail.ru

Using the docking and artificial neural network methods, a model of the RAGE-NF-kB signaling pathway was constructed, linking the RAGE inhibitory activity of chemical compounds with their affinity for 22 relevant target proteins.

Key words: RAGE inhibitors; target proteins; docking; artificial neural networks; RAGE-NF-kB signaling pathway model.

For the human RAGE-NF-kB signaling pathway, 14 major nodes were identified and 78 types of monofunctional proteins, subunits, and isoforms of biotargets of this signaling were found. As a result of text-mining, 34 relevant biotargets were isolated from 78 proteins, 826 of their 3D models were found. After verification, 22 biotargets were selected from these 34 target proteins, for which 66 valid 3D models were identified. By means of molecular mechanics and quantum chemistry methods, 3D models of 183 known RAGE inhibitors were constructed. Using

the AutoDock Vina program, an ensemble docking of these compounds into sites 66 of the 3D models of 22 valid target proteins was performed, and the minimum docking energy ΔE was determined. A training set was formed on the levels of activity and affinity of 183 known RAGE inhibitors in relation to 22 target proteins of the RAGE–NF- κ B signaling pathway, which includes 4026 ΔE values. Using the method of artificial multilayer perceptron neural networks with the “bottleneck” architecture, the RAGE–NF- κ B signaling pathway model was built using Statistica Neural Networks software. Using the ROCK analysis method, the accuracy of the obtained model was estimated, which for a high level of RAGE inhibitory activity was 90% ($p < 0.001$). The model makes it possible to predict the experimental level of RAGE inhibitory activity of chemical compounds according to calculated values of their affinity for 22 target proteins of the RAGE–NF- κ B signaling pathway. The resulting model will be used for the targeted search for highly active systemic multifunctional multitarget RAGE-inhibitors for the treatment of patches in diabetes mellitus and Alzheimer’s disease.

This work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (project 18-015-00499).

УДК 577.21

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ ИМЕЮЩИХ НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОВТОРЫ

Белкожаев А.М., Ниязова Р.Е.

НИИ Проблем биологии и биотехнологии, КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан
 050038, Алматы, Проспект аль-Фараби, д. 71, корп. 6
 e-mail: Ayaz_jarkent@mail.ru

Нуклеотидные повторы в 5'UTR, CDS и 3'UTR имеют важное биологическое значение, поэтому необходимо изучить особенности взаимодействия miRNA с mRNA генов, имеющих нуклеотидные повторы.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, нуклеотидные повторы, ген

Гены имеющие нуклеотидные повторы являются одной из основных причин развития наследственных заболеваний человека [1]. В данной работе изучались особенности связывания miRNA с mRNA генов, имеющих нуклеотидные повторы. Нуклеотидные последовательности mRNA 95 генов человека были получены из Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), и 2567 miRNA были взяты из miRBase (<http://mirbase.org>). Поиск генов мишеней для miRNA проводили, используя программу MirTarget [2]. Сайты связывания miRNA с mRNA отбирали с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным 86% и более. Из них 73 сайтов связывания расположены в CDS, 28 сайтов в 5'UTR и 194 сайтов в 3'UTR. Результаты исследования показали, что из 95 генов, имеющих нуклеотидные повторы, в mRNA только 56 генов найдены 295 сайтов связывания miRNA. В mRNA гена *HTT* имелись сайты связывания miRNA с величиной $\Delta G/\Delta G_m$, выше 90%. Нами установлены miRNA, связывающиеся с высокой эффективностью с mRNA гена *HTT* (CAG повторы). Полученные результаты показывают, что 16 генов с нуклеотидными повторами, являются мишенями двух и более miRNA: *ADRB3* (miR-466, miR-6845-5p) динуклеотидные повторы GU, *GHR* (miR-1273a, miR-1273c, miR-1273f) динуклеотидные повторы UC, *IGF2R* (miR-4307, miR-466, miR-4734) тринуклеотидные AAG и динуклеотидные повторы UG, *LDLR* (miR-1303, miR-6751-5p) динуклеотидные повторы AC, *TGFB1* (miR-4651, miR-6824-5p, miR-6877-5p, miR-877-3p) пентануклеотидные GCCCC и тринуклеотидные повторы GCC, *TNFRSF18* (miR-4298, miR-8073) тринуклеотидные повторы UCC, *VSNL1* (miR-574-5p, miR-7111-3p, miR-877-3p) динуклеотидные повторы AC, *XRCC1* (miR-4763-3p, miR-574-5p) динуклеотидные повторы AC, *HLA-A* (miR-4786-3p, miR-548ah-3p) тетрануклеотидные повторы GGGC, *HTT* (miR-1200, miR-185-5p, miR-203a, miR-4722-3p, miR-5008-5p, miR-5193, miR-6072, miR-6722-3p, miR-6746-5p, miR-6748-5p, miR-6778-5p, miR-1322) динуклеотидные UG и тринуклеотидные повторы CAG, *ATXN2* (miR-6089, miR-466) динуклеотидные повторы GU, *EP400* (miR-6089, miR-6874-3p, miR-6882-3p) тринуклеотидные повторы CAG, *FAM157B* (miR-1273g-3p, miR-3162-3p, miR-3193) тринуклеотидные повторы CUC, *IRF2BPL* (miR-5091, miR-7110-5p) динуклеотидные повторы UC, *IRS1* (miR-4655-3p, miR-466) динуклеотидные повторы GU, *KIAA2018* (miR-1277-5p, miR-574-5p) динуклеотидные повторы AU. В результате нами были отобраны шесть miRNA, которые имеют сайты связывания с высокой свободной энергией связывания в mRNA двух и более генов, имеющих нуклеотидные повторы: miR-466 (*ADCYAP1R*, *ADRB3*, *FGF9*, *IGF2R*, *SEMA6D*, *IRS1*, *NCOA3*), miR-574-5p (*DMD*, *KLF7*, *VSNL1*, *XRCC1*, *AFF3*, *ARID3B*, *KIAA2018*), miR-1273a (*CYP4F3*, *GHR*, *KCNN3*, *MPRIIP*), miR-1273f (*GHR*, *MEF2A*), miR-1273g-3p (*AFF3*, *FAM157B*,

KCNN3, KIAA2018, MEF2A), miR-6089 (TGFB1, ATXN2, EP400). Гены CYP4F3, GHR, KCNN3, MPRIP, GHR, MEF2A, AFF3, FAM157B, KCNN3, KIAA2018, MEF2A являются мишенями для семейства miR-1273. Для некоторых miRNA обнаружены полисайты: для miR-466 – девять сайтов в mRNA гена ADCYAP1R1, 11 сайтов в mRNA гена ADRB3, восемь сайтов в mRNA гена FGF9, семь сайтов в mRNA гена IGF2R, 12 сайтов в mRNA гена SEMA6D, шесть сайтов в mRNA гена IRS1 и четыре сайта в mRNA гена NCOA3; для miR-574-5p – шесть сайтов в mRNA гена DMD, три сайта в mRNA гена KLF7, 13 сайтов в mRNA гена VSNL1, 11 сайтов в mRNA гена XRCC1, семь сайтов в mRNA гена AFF3, три сайта в mRNA гена ARID3B, девять сайтов в mRNA гена KIAA2018.

Литература:

1. Сиянова Е.Ю., Миркин С.М. Экспансия тринуклеотидных повторов // Молекулярная биология. – 2001. - №2. – С. 208-223.
2. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformation. – 2014. - 10(7). – P. 423-427

UDC 577.21

FEATURES OF miRNA BINDING WITH mRNA OF GENES HAVING NUCLEOTIDE REPEATS

Belkoshayev A.M., Niyazova R.E.

Research Institute of Problems of Biology and Biotechnology, al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
050038, Almaty, Prospect al-Farabi, 71, corp.6
e-mail: Ayaz_jarkent@mail.ru

Nucleotide repeats in 5'UTR, CDS and 3'UTR have an important biological significance, therefore it is necessary to study the features of the interaction of miRNA with mRNA genes having nucleotide repeats.

Key words: miRNA, mRNA, nucleotide repeats, gene

Genes with nucleotide repeats are one of the main causes of the development of human hereditary diseases [1]. In this paper, the features of miRNA binding to mRNA genes with nucleotide repeats were studied. The nucleotide sequences of the mRNA 95 human genes were obtained from Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), and 2567 miRNAs were taken from miRBase (<http://mirbase.org>). Search for miRNA target genes was performed using the MirTarget program [2]. The miRNA binding sites for mRNA were selected with an $\Delta G/\Delta G_m$ ratio of 86% or more. Of these, 73 binding sites are located in CDS, 28 sites in 5'UTR and 194 sites in 3'UTR. The results of the study showed that of the 95 genes having nucleotide repeats, only 56 genes in the mRNA are 295 miRNA binding sites. In the mRNA of the *HTT* gene, there were miRNA binding sites with $\Delta G/\Delta G_m$, above 90%. We have established miRNAs that bind with high efficiency to the mRNA of the *HTT* gene (CAG repeats). The results show that 16 genes with nucleotide repeats are targets of two or more miRNAs: *ADRB3* (miR-466, miR-6845-5p) dinucleotide repeats GU, *GHR* (miR-1273a, miR-1273c, miR-1273f) dinucleotide repeats UC, *IGF2R* (miR-4307, miR-466, miR-4734) trinucleotide AAG and dinucleotide repeats UG, *LDLR* (miR-1303, miR-6751-5p) dinucleotide repeats AC, *TGFB1* (miR-4651, miR-6824-5p, miR-6877-5p, miR-877-3p) pentanucleotide GCCCC and trinucleotide repeats GCC, *TNFRSF18* (miR-4298, miR-8073) trinucleotide repeats UCC, *VSNL1* (miR-574-5p, miR-7111-3p, miR-877-3p) dinucleotide repeats AC, *XRCC1* (miR-4763-3p, miR-574-5p) dinucleotide repeats AC, *HLA-A* (miR-4786-3p, miR-548ah-3p) tetranucleotide repeats GGGC, *HTT* (miR-1200, miR-185-5p, miR-203a, miR-4722-3p, miR-5008-5p, miR-5193, miR-6072, miR-6722-3p, miR-6746-5p, miR-6748-5p, miR-6778-5p, miR-1322) dinucleotide UG and trinucleotide repeats of CAG, *ATXN2* (miR-6089, miR-466) dinucleotide repeats GU, *EP400* (miR-6089, miR-6874-3p, miR-6882-3p) trinucleotide repeats CAG, *FAM157B* (miR-1273g-3p, miR-3162-3p, miR-3193) trinucleotide repeats CUC, *IRF2BPL* (miR-5091, miR-7110-5p) dinucleotide repeats UC, *IRS1* (miR-4655-3p, miR-466) dinucleotide repeats GU, *KIAA2018* (miR-1277-5p, miR-574-5p) dinucleotide repeats AU. As a result, we selected six miRNAs that have binding sites with high free binding energy in mRNA of two or more genes with nucleotide repeats: miR-466 (*ADCYAP1R*, *ADRB3*, *FGF9*, *IGF2R*, *SEMA6D*, *IRS1*, *NCOA3*), miR-574 -5p (*DMD*, *KLF7*, *VSNL1*, *XRCC1*, *AFF3*, *ARID3B*, *KIAA2018*), miR-1273a (*CYP4F3*, *GHR*, *KCNN3*, *MPRIP*), miR-1273f (*GHR*, *MEF2A*), miR-1273g-3p (*AFF3*, *FAM157B*, *KCNN3*, *KIAA2018*, *MEF2A*), miR-6089 (*TGFB1*, *ATXN2*, *EP400*). Genes *CYP4F3*, *GHR*, *KCNN3*, *MPRIP*, *GHR*, *MEF2A*, *AFF3*, *FAM157B*, *KCNN3*, *KIAA2018*, *MEF2A* are targets for the miR-1273 family. For some miRNA polysites were found: for miR-466, nine sites in the mRNA *ADCYAP1R1* gene, 11 sites in the mRNA *ADRB3* gene, eight sites in the mRNA *FGF9* gene, seven sites in the

mRNA *IGF2R* gene, 12 sites in the mRNA *SEMA6D* gene, six sites in the mRNA the *IRS1* gene and four sites in the mRNA *NCOA3* gene; for miR-574-5p, six sites in the mRNA *DMD* gene, three sites in the mRNA *KLF7* gene, 13 sites in the mRNA *VSNL1* gene, 11 sites in the mRNA *XRCC1* gene, seven sites in the mRNA *AFF3* gene, three sites in the mRNA *ARID3B* gene, nine sites in the mRNA *KIAA2018* gene.

References:

1. Siyanova E.Y., Mirkin S.M. Expansion of trinucleotide repeats // *Molecular Biology*. - 2001. - №2. - p. 208-223.
2. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // *Bioinformation*. - 2014. - 10 (7). - P. 423-427

ПОИСК НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК КАК НУКЛЕОСОМНЫХ БАРЬЕРОВ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

Теванян Э.А., Попцова М.С.

Лаборатория биоинформатики, Департамент больших данных и информационного поиска, факультет компьютерных наук, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Россия, 125319, г. Москва, Кочновский проезд, д.3
 e-mail: etevanian@hse.ru; mpoptsova@hse.ru

Мы обучили алгоритм случайного леса для распознавания паттернов взаимного расположения нуклеосом и вторичных структур ДНК, которые могут служить барьерами для нуклеосом, в геноме мыши. Мы показали, что среди четырех типов рассмотренных структур (Z-ДНК, H-ДНК, G-квадруплексов и участков SIDD) лучшее качество модели достигается для G-квадруплексов и H-ДНК.

Ключевые слова: вторичные структуры ДНК, G-квадруплексы, H-ДНК, Z-ДНК, нуклеосомные барьеры, расположение нуклеосом, методы машинного обучения, случайный лес

Геномы обладают большим потенциалом образования вторичных структур ДНК, которые воздействуют на различные геномные процессы, включая транскрипцию. Одним из механизмов регуляции транскрипции является регуляция расположения нуклеосом. Хотя нуклеосомы наматываются только на каноническую, так называемую, В-форму, другие, отличные от В-формы, структуры ДНК могут конкурировать с нуклеосомами за расположение в геноме или служить барьерами, разделяющими нуклеосомные массивы.

В данной работе мы использовали данные перманганат/S1 нуклеаз-футпринтинга [1], который позволяет определить потенциальные сайты образования вторичных структур ДНК на участках расплетенной ДНК. Для определения расположения нуклеосом мы использовали данные MNase-seq [1]. Компьютерная аннотация генома мыши вторичными структурами ДНК производилась с помощью следующих программ и алгоритмов: Z-ДНК – Zhunt [2], H-ДНК – Inverted Repeats Finder [3], G-квадруплексы – QuadParser [4], участки SIDD – алгоритм из [5]. В результате в геноме мыши существует потенциально 250-420 тысяч сайтов образования структур каждого типа, в то время как число вторичных структур ДНК, обогащенных участками расплетенной ДНК, которые были обнаружены при помощи метода перманганат/S1 нуклеаз-футпринтинга, составляет 4-8% от числа структур, предсказанных с помощью компьютерных программ.

Для анализа взаимного расположения нуклеосом и вторичных структур ДНК мы рассмотрели области в 500 п.о., центрированных на структуре. Анализ нуклеосомных профилей вокруг структур ДНК выявил три типа паттернов: 1) структура окружена нуклеосомой с двух сторон, 2) структура расположена только с одной стороны нуклеосомы и 3) на участке нет нуклеосом.

Используя статистику динуклеотидов и триплетов, мы построили модель машинного обучения (классификатор по алгоритму случайного леса), распознающую принадлежность региона к одному из паттернов. Качество модели по метрике ROC-AUC достигло 86% для G-квадруплексов, 79% для H-ДНК, 73% для SIDD и 63% для Z-ДНК.

Модель может быть улучшена добавлением новых характеристик, в числе которых физические и химические свойства ДНК последовательности, такие, как энтальпия, энтропия, энергия Гиббса, гидрофильность, а также структурные свойства спирали (Shift, Rall, Slide, Rise, Tild, Bend), доступные в базе данных DiProDB [6]. Возможно, добавление новых характеристик и не улучшит качество модели, но даст возможность определить, какие структурные свойства ДНК играют важную роль в классификации паттернов.

Литература:

1. Kouzine F, Wojtowicz D, Baranello L., et al. Permanganate/S1 Nuclease Footprinting Reveals Non-B DNA Structures with Regulatory Potential across a Mammalian Genome // *Cell Syst.* – 2017. – №4(3). – c.344-356.
2. Ho P.S., Ellison M.J., Quigley G.J., and Rich A.A. Computer aided thermodynamic approach for predicting the formation of Z-DNA in naturally occurring sequences // *EMBO J.* – 1986 – №5(10). – c.2737-2744.
3. Warburton P.E., Giordano J., Cheung F., Gelfand Y., and Benson G. Inverted repeat structure of the human genome: the X-chromosome contains a preponderance of large, highly homologous inverted repeats that contain testes genes // *Genome Res.* – 2004. – №14 (10A) . – c.1861-1869.
4. Huppert J.L., and Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – №33 (9) . – c.2908-2916.
5. Wang H., Noordewier M., and Benham C.J. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the *E. coli* genome: SIDD sites are closely associated with promoters // *Genome Res.* – 2004. – №14(8) . – c.1575-1584.
6. Friedel M., Nikolajewa S., Suhnel J., and Wilhelm T. DiProDB: a database for dinucleotide properties // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – №37 (Database issue). – c.37-40.

SEARCHING FOR NON-B-DNA STRUCTURES AS NUCLEOSOME BARRIERS WITH MACHINE LEARNING METHODS

E. A. Tevanyan, M. S. Poptsova

Laboratory of Bioinformatics, Big Data and Information Retrieval School, Faculty of Computer Science, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia, 125319, Moscow, Kochnovskiy proezd, 3
e-mail: etevanian@hse.ru; mpoptsova@hse.ru

We trained Random Forest model to recognize patterns of nucleosome and non-B DNA structures, considered as potential nucleosome barriers in the mouse genome. We showed that among four types of structures – Z-DNA, H-DNA, G-Quadruplexes and SIDD regions – recognition of G-Quadruplexes and H-DNA showed the best performance.

Key words: DNA structures, G-quadruplexes, H-DNA, Z-DNA, nucleosome barriers, nucleosome positioning, machine-learning methods, random forest

Non-B DNA structures have a great potential to form and influence various genomic processes including transcription. One of the mechanisms of transcription regulation is nucleosome positioning. Even though only B-DNA can be wrapped around a nucleosome, non-B DNA structures can compete with nucleosomes for a genomic location or serve as barriers separating arrays of nucleosomes.

Here we used the data for mouse genome from Permanganate/S1 Nuclease Footprinting [1] that could detect potential sites of unwound DNA with non-B DNA structures formed in the unwound region. For nucleosome maps we took MNase-Seq data from [1]. Computer annotations of mouse genome with DNA secondary structures were performed with the following programs: Z-DNA – Zhunt [2], H-DNA - Inverted Repeats Finder [3], G-quadruplexes – QuadParser [4], SIDD – the algorithm is taken from [5]. The number non-B DNA structures in mouse genome, inferred by computer methods ranges in 250-420 thousands structures for each type, and the number of non-B DNA structures enriched in the regions of single-stranded DNA detected with Permanganate/S1 Nuclease Footprinting [1] comprises 4-8% of the computer predicted structures.

To analyze an association of nucleosomes and DNA structures we considered a region of 500 bp centered on a DNA structure. Nucleosome profiles around DNA structures revealed three types of patterns: a structure is surrounded by nucleosomes from both sides, from one side, or the region around a structure is nucleosome free.

We built and trained machine learning models (Random forest classifier) to recognize regions containing a particular pattern based on di- and trinucleotide composition of 500 bp region containing the pattern. Model performance reached 86% AUC for G-quadruplexes, 79% for H-DNA, 73% for SIDD and 63% for Z-DNA.

The model can be improved by taking into account physical and chemical properties of DNA such as enthalpy, entropy, Gibbs energy, hydrophilicity, as well as helical structural properties of dinucleotides (Shift, Roll, Slide, Rise, Tilt, Bend) available in DiProDB [6]. Even though it might not improve the model it could provide an understanding, which properties mainly contribute to the classification model.

References:

1. Kouzine F, Wojtowicz D, Baranello L., et al. Permanganate/S1 Nuclease Footprinting Reveals Non-B DNA Structures with Regulatory Potential across a Mammalian Genome // *Cell Syst.* – 2017. – №4(3). – c.344-356.

2. Ho P.S., Ellison M.J., Quigley G.J., and Rich A.A. Computer aided thermodynamic approach for predicting the formation of Z-DNA in naturally occurring sequences // *EMBO J.* – 1986 – №5(10). – с.2737-2744.
3. Warburton P.E., Giordano J., Cheung F., Gelfand Y., and Benson G. Inverted repeat structure of the human genome: the X-chromosome contains a preponderance of large, highly homologous inverted repeats that contain testes genes // *Genome Res.* – 2004. – №14 (10A). – с.1861-1869.
4. Huppert J.L., and Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – №33 (9). – с.2908-2916.
5. Wang H., Noordewier M., and Benham C.J. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the *E. coli* genome: SIDD sites are closely associated with promoters // *Genome Res.* – 2004. – №14(8). – с.1575-1584.
6. Friedel M., Nikolajewa S., Suhnel J., and Wilhelm T. DiProDB: a database for dinucleotide properties // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – №37 (Database issue). – с.37-40.

УДК: 577.2, 577.1

ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ В «СКРЫТОЙ» ЧАСТИ ТРАНСКРИПТОМОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

М.А. Генаев¹, Н.А. Шамаков¹, З.С. Мустафин¹, А.М. Мухин^{1,2}, Д.К. Константинов^{1,2}, А.В. Дорошков^{1,2}, С.А. Лашин^{1,2}, Д.А. Афонников^{1,2}

¹Федеральный Исследовательский Центр Институт цитологии и генетики СО РАН,

²Новосибирский Государственный Исследовательский Университет

Проведен массовый анализ RNA-seq экспериментов, содержащихся в публичном архиве ENA для пяти видов сельскохозяйственных культур: рис, ячмень, картофель, кукуруза и томат. Всего было обработано ~1300 экспериментов. Для каждого эксперимента проведена реконструкция последовательностей транскриптов de novo, и на основе выравнивания определены транскрипты, которые не имеют сходства с референсным геномом. Доля последовательностей, которые выравнивались на геном, но не попали на аннотированные локусы, составляет 20-25% от всех транскриптов, а доля невыровненных последовательностей составляет до 5%. Анализ не выровненных и не аннотированных транскриптов показал, что некоторые из них имеют высокий уровень сходства с вирусами и другими патогенами растений, последовательностями некодирующих РНК растений, рибосомных РНК, повторов. Среди “новых” генов нами также были идентифицированы последовательности возможных генов устойчивости к патогенам.

Ключевые слова: сельскохозяйственные культуры, транскриптом, секвенирование, аннотация генов, омиксные базы данных

Анализ транскриптомов сельскохозяйственных культур на основе экспериментов RNA-seq является одним из эффективных направлений поиска генов, связанных с такими признаками как устойчивость к вредителям и факторам среды. Однако большинство результатов RNA-seq представляют собой анализ экспрессии генов на основе картирования прочтений на референсный геном. Мы предположили, что новые гены в геномах культурных растений могут быть обнаружены на основе идентификации транскриптов которые (а) не выравниваются на референсный геном либо (б) выравниваются на ранее неаннотированные геномные локусы. Чтобы оценить долю таких новых генов в геномах пяти сельскохозяйственных культур (кукуруза, рис, томат, картофель и ячмень) проведен массовый анализ транскриптомов, взятых из доступных SRA архивов ENA (всего ~1300 библиотек).

Для каждого транскриптома проведена реконструкция последовательностей de novo, и на основе выравнивания определены транскрипты, которые не имеют сходства с референсным геномом (новые транскрипты) или выравниваются в ранее неаннотированные его локусы (неаннотированные транскрипты). Оказалось, что для 5 организмов в среднем доля выровненных транскриптов, составила в среднем 96% от их общего числа. Доля последовательностей, которые выравнивались на геном, но не попали на аннотированные локусы, составляет 20-25% от всех транскриптов, а доля невыровненных последовательностей составляет до 5%.

Сравнение полученных транскриптов с последовательностями из специализированных баз данных аннотаций нуклеотидных последовательностей показало, что контаминация векторными последовательностями незначительна (в среднем около 20 транскриптов на каждый транскриптом). В то же время среди невыровненных последовательностей нами были обнаружены последовательности,

имеющие высокий уровень сходства с вирусами и другими патогенами растений, последовательностями некодирующих РНК растений, рибосомных РНК, повторов.

Нами также были идентифицированы последовательности возможных генов устойчивости к патогенам: для 181 новых транскриптов и 1707 неаннотированных транскриптов было предсказано наличие полного набора доменов, характерных для таких генов (NBS-LRR доменов).

Полученные результаты демонстрируют, что предложенная стратегия поиска новых генов в транскриптомах растений является продуктивной.

Работа поддержана грантом РФФ 18-14-00293.

UDC: 577.2, 577.1

SEARCH FOR NEW GENES IN THE "HIDDEN" PART OF AGRICULTURAL PLANT TRANSCRIPTOMES

M.A. Genaev¹, N.A. Shmakov¹, Z.S. Mustafin¹, A.M. Mukhin^{1,2}, D.K. Konstantinov^{1,2}, A.V. Doroshkov^{1,2}, S.A. Lashin^{1,2}, D.A. Afonnikov^{1,2}

¹Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,

²Novosibirsk State Research University

A mass analysis of the RNA-seq experiments contained in the ENA public archive for crops: rice, barley, potato, corn, and tomato was carried out. A total of ~1300 experiments were processed. For each experiment, the de novo transcript sequence was reconstructed, and transcripts that have no similarity to the reference genome were determined on the basis of alignment. The proportion of sequences that are aligned to the genome, but did not fall on the annotated loci, is 20–25% of all transcripts, and the proportion of not aligned sequences is 5%. The analysis of non-aligned or non-annotated transcripts showed that some of them have a high level of similarity with viruses and other plant pathogens, sequences of non-coding plant RNA, ribosomal RNA, repeats. Among the "new" genes, we also identified sequences of pathogen resistance genes.

Key words: crops, transcriptome, sequencing, gene annotation, omix databases

Analysis of crop transcriptomes based on RNA-seq experiments is one of the effective ways of searching for genes associated with such traits as resistance to pests and environmental factors. However, most of the results of RNA-seq are an analysis of gene expression based on the mapping reads on the reference genome. We assumed that new genes in the genomes of cultivated plants can be detected based on the identification of transcripts that (a) are not aligned to the reference genome, or (b) are aligned to previously non-annotated genomic loci. In order to estimate the share of such genes in the genomes of five agricultural crops (corn, rice, tomato, potatoes, and barley), a mass analysis of transcriptomes taken from the available ENA SRA archives (total of ~ 1300 libraries) was carried out.

For each transcriptome, de novo sequences were reconstructed, and based on alignment, transcripts were identified that have no similarity to the reference genome (new transcripts) or are aligned to its previously unannotated loci (non-annotated transcripts). It turned out that for 5 organisms, on average, the proportion of aligned transcripts amounted to an average of 96% of their total number. The proportion of sequences that are aligned to the genome, but did not fall on the annotated loci, is 20–25% of all transcripts, and the proportion of unaligned sequences is up to 5%.

Comparison of the obtained transcripts with sequences from specialized databases of nucleotide sequence annotations showed that contamination with vector sequences is insignificant (on average, about 20 transcripts for each transcript). At the same time, among the unaligned sequences, we found sequences that have a high level of similarity with viruses and other plant pathogens, sequences of non-coding plant RNA, ribosomal RNA, and repeats.

We also identified the sequences of possible pathogen resistance genes: for 181 new transcripts and 1707 non-annotated transcripts, the presence of the full set of domains characteristic of such genes (NBS-LRR domains) was predicted.

The obtained results demonstrate that the proposed strategy of searching for new genes in plant transcriptomes is productive.

This work was supported by a grant of the Russian National Science Foundation 18-14-00293.

УДК: 575, ББК: 28.04

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ЗНАНИЯ ИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ АССОЦИАЦИЙ С ПОМОЩЬЮ ПЛАТФОРМЫ GWAS-MAP

Т.И.Шашкова¹, Д.Д.Горев², Я.А.Цепилов¹, Е.Д.Пахомов¹, А.А. Торгашева², П.Джоши³, Ю.С.Аульченко²
¹Новосибирский Государственный Университет, Россия, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1,
e-mail: shashkova@phystech.edu
²Институт Цитологии и Генетики СО РАН

³Университет Эдинбург

В данной работе мы представляем платформу GWAS-MAP, которая позволяет интегрировать, хранить и обрабатывать результаты полногеномных исследований ассоциаций. Для демонстрации работы системы, как подхода для извлечения новых биологических знаний и постановки механистических гипотез, был проведен анализ варикозного расширения вен. Мы подтвердили известные эпидемиологические ассоциации для данного заболевания и выдвинули гипотезу о том, что уровень белков MICB and CD209 в плазме крови человека может влиять на риск варикозного расширения вен.

Ключевые слова: геномика, полногеномное исследование ассоциаций, ПГИА, база данных, количественная генетика, варикозное расширение вен

Введение.

Полногеномные исследования ассоциаций (ПГИА или genome-wide association studies, GWAS) - методология исследований, которая приобрела большую популярность за последнее десятилетие [1]. Результаты ПГИА (РПГИА) публикуются в виде суммарных статистик – для каждого однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) представляется информация о частотах аллелей и характеристики эффекта аллеля на фенотип. Такая информация может быть использована для решения множества задач - от исследования в фундаментальной биологии и генетики до поиска биомаркеров и мишеней терапевтического воздействия.

В то время как количество РПГИА, собранных научным сообществом, растёт, использование этих данных ограничено отсутствием общепринятых практик работы. В частности, исследователи сталкиваются со следующими проблемами. Во-первых, это гигантский объем данных, который требует развития инфраструктуры. Во-вторых, кроме хранения первичных данных, необходимо обеспечить их предобработку. В-третьих, однотипные данные генерируются в разных лабораториях по разным протоколам, что требует процедуры интеграции для обеспечения универсального хранения. Наконец, необходимо разрабатывать пользовательские интерфейсы, которые позволили бы исследователям, далеким от информационных технологий, работать с ними.

Для решения этих проблем нами разрабатывается платформа GWAS-MAP, предназначенная для хранения и обработки РПГИА. Система предоставляет возможность проводить исследования, которые будут непосредственно способствовать поиску новых биомаркеров, способствующих созданию высокоэффективных лекарств. В качестве примера и демонстрации состоятельности данного подхода нами был проведен анализ варикозного расширения вен.

Результаты.

Архитектура платформы GWAS-MAP.

Платформа GWAS-MAP состоит из базы данных (БД) и трех модулей обработки данных: интеграции, контроля качества (quality control, QC) и анализа РПГИА (Рисунок 1). Интеграция включает в себя преобразование РПГИА, поступающих из разных консорциумов (доступных источников), в универсальный формат. После приведения данных в единый формат, РПГИА проходят процедуру QC и в случае удовлетворительных результатов РПГИА сохраняются в БД.

БД - это часть платформы, которая предоставляет единый интерфейс доступа к интегрированным РПГИА. БД состоит из двух компонент, каждая из которых находится под управлением своей СУБД. Первая компонента разработана для хранения и быстрого доступа к РПГИА и управляется СУБД ClickHouse. Записью являются параметры ОНП в конкретном РПГИА. Компонента под управлением СУБД PostgreSQL содержит информацию об исследовании, в ходе которого был получен РПГИА, а также результаты анализов и другую вспомогательную информацию.

Анализ РПГИА осуществляется набором интегрированных в платформу аналитических инструментов, написанных на языке Python и доступных через утилиты командной строки.



Рисунок 1. Схема архитектуры платформы GWAS-MAP.

Интеграция РПГИА.

В рамках платформы реализована возможность загрузки пользователем оригинальных данных РПГИА (файлов суммарных статистик). Поскольку данные РПГИА генерируются в разных лабораториях с использованием различных протоколов, то полученные в результате файлы суммарных статистик могут быть представлены в разных форматах и содержать различные поля. Для решения этой проблемы разработан модуль интеграции, приводящий РПГИА в единый формат. Результатом интеграции является файл, обладающий жестко заданной структурой. Для обеспечения согласованности данных внутри системы информация об идентификационном номере ОНП, его позиции в геноме, аллелях и частотах аллелей сверяется с данными из референтной выборки (далее референс). На текущий момент нами используется референс геномов европейцев, полученный в ходе реализации проекта "1000 геномов" (1000G фаза 3 версия 5). Если РПГИА не содержат всех необходимых для единого формата полей, то данные поля заполняются из референса или рассчитываются из представленной в файле информации. Например, таким образом возможно восстановление z-статистики, если РПГИА содержит оценки эффекта аллеля и средней квадратичной ошибки эффекта.

Контроль качества (QC) РПГИА.

Необходимой процедурой перед загрузкой РПГИА в БД является QC. Как показывает практика, процедура QC является незаменимой не только при проведении мета-анализа РПГИА, но и для проверки отдельно взятых исследований, поскольку кажущиеся незначительными ошибки в предоставленных данных могут привести к значимым ложным результатам дальнейших анализов. В нашей системе был разработан модуль QC, позволяющий выявить конкретные ОНП с характеристиками отличными от ожидаемых, а также оценить качество РПГИА в целом.

В частности, QC включает в себя сравнение частот аллелей РПГИА с частотами аллелей из референтной выборки, сравнение предоставленного в РПГИА p-value и p-value, рассчитанного по представленной z-статистике, анализ распределения оценок эффекта аллеля, расчет дисперсии признака и геномного контроля (lambda GC). ОНП с отклонением характеристик от ожидаемых более чем на пороговое значение, маркируются как статистические выбросы и по требованию пользователя могут быть исключены из дальнейших анализов.

Методы анализа РПГИА, имплементированные в систему.

В рамках системы встроены широко используемые методы анализа РПГИА с упором на идентификацию функциональных вариантов, генов, молекул и признаков, являющихся потенциальными мишенями терапевтического воздействия. В частности, система позволяет осуществлять обработку данных с использованием следующих методов:

Linkage Disequilibrium score regression - метод для оценки наследуемости признака и расчета генетических корреляций между двумя признаками [2].

Методы менделевской рандомизации - набор тестов, которые позволяют устанавливать причинно-следственную связь между двумя признаками [3].

Summary-level mendelian randomization (SMR) и heterogeneity in dependent instruments (HEIDI) - тесты, которые позволяют установить, что два различных признака имеют один и тот же функциональный вариант в локусе или же они контролируются двумя различными функциональными вариантами, находящимися в неравновесии по сцеплению. Для проведения HEIDI теста помимо РПГИА необходима информация о структуре неравновесия по сцеплению [4].

Dimitrieva-Georges Theta - является альтернативой HEIDI. Этот метод оценивает сходство профилей ассоциации на основе только суммарных статистик. Данный метод является предпочтительней, в случае отсутствия информации о структуре неравновесия по сцеплению, соответствующей сравниваемым ПГИА [5].

Два последних метода применяются, в частности, для приоритизации генов связанных с локусом, путем сравнения паттернов ассоциации экспрессии генов и интересующего признака.

Содержание базы данных.

На данный момент БД РПГИА содержит 3,795 исследований, что составляет около 8,5 млн пар ОНП-признак ассоциаций. В частности 2,452 признаков - это результаты исследований по данным УК Биобанка, 123 - метаболомика, 1,206 - протеомика. Для удобства использования РПГИА система также содержит ключевую информацию о каждом исследовании, например данные о публикации, референсе и деталях проведения эксперимента.

Анализ варикозного расширения вен.

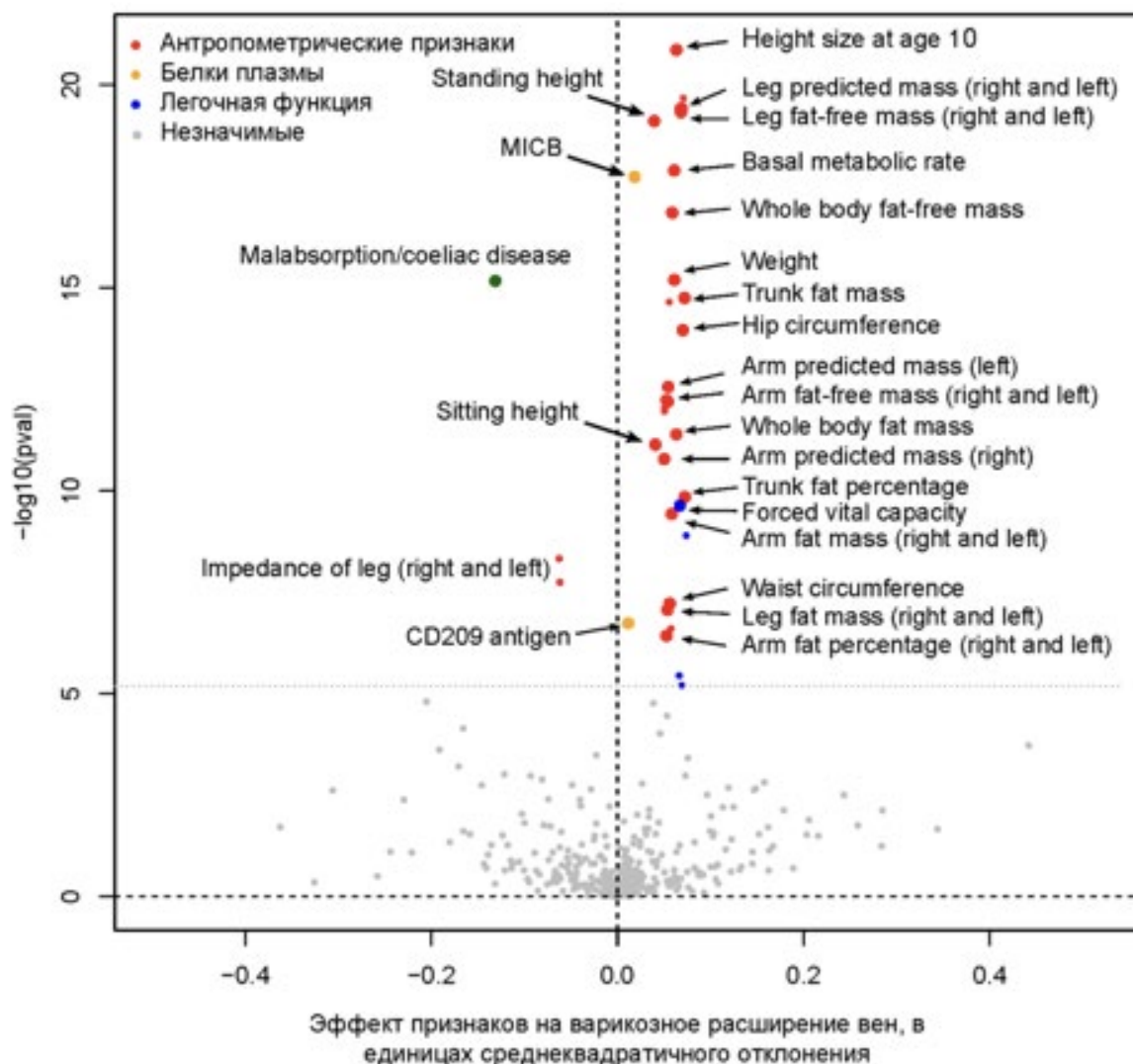


Рис. 2. "Вулканический" график, показывающий результаты анализа причинно-следственных связей между ВВ и его факторов риска методом Менделевской рандомизации. На оси X отображены значения эффектов признаков на ВВ, полученные методом обратных взвешенных дисперсий; ось Y – минус логарифм уровня статистической значимости эффекта.

Варикозное расширение вен (ВВ) является одним из клинических проявлений хронического венозного заболевания, представляющим как косметическую, так и медицинскую проблему. Мы демонстрируем результаты широкомасштабного исследования ВВ, выполненного по доступным генетическим данным при помощи платформы GWAS-MAP [6], в качестве примера использования представленного подхода. В ходе анализа генетических корреляций были подтверждены известные положительные этиологические корреляции ВВ с ростом и весом, а также такими признаками, как тромбоз глубоких вен, курение, боль и количество перенесенных операций. Показаны отрицательные генетические корреляции ВВ с показателями интеллекта и уровнем образования. Более того, было показано, что тромбоз глубоких вен и ВВ имеют общие функциональные геномные варианты, не ассоциированы с другими вышеупомянутыми факторами. Была установлена причинно-следственная связь между ВВ и антропометрическими признаками, такими как рост, размер талии, окружность бедер и вес (как для жира, так и для мышечной массы), а также уровнями белков MICB и CD209 в плазме крови человека (Рисунок 2). Повышение значений по данным показателям ведет к увеличению риска ВВ. На основании полученных результатов, нами выдвинута гипотеза, что повышение уровней белков MICB и CD209 является фактором риска для ВВ. При этом, нами было также показано, что белок CD209 может опосредовать связь между полиморфизмом гена ABO и ВВ, а также между ВВ и группой крови А. Оба белка участвуют во врожденном и адаптивном иммунитете, что consistently с известной ролью воспалительных процессов в развитии ВВ.

В ходе данной работы была разработана платформа GWAS-MAP, предназначенная для хранения и обработки РПГИА. На данный момент в БД системы содержится около 4000 РПГИА. Интерфейс системы предоставляет универсальный способ работы с данными, что позволяет быстро встраивать новые методы анализа в систему. Пользователи могут работать с системой через утилиты командной строки, с помощью которой имеют возможность загружать данные в систему, а также запускать анализы и получать их результаты. Анализ варикозного расширения вен продемонстрировал потенциал системы для формулирования новых биологических гипотез, как, например, постулированная нами причинная связь между уровнями белков MICB и CD209 в плазме крови человека и ВВ.

Разработка системы GWAS-MAP была поддержана грантами по программе меж институтских связей для Новосибирского государственного университета и Эдинбургского университета (номер проекта № IL4277322879) (ТШ, ДГ, ПД), министерства науки и образования Российской Федерации в рамках программы 5-100 (ЕП, ЯЦ). Работа ЮА была финансирована Институтом Цитологии и Генетики при поддержке федерального агентства научных организаций (проект #0324-2019-0040).

Литература:

1. Visscher P. M. et al. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation // *The American Journal of Human Genetics*. – 2017. – Т. 101. – №. 1. – С. 5-22.
2. Bulik-Sullivan B. K. et al. LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies // *Nature genetics*. – 2015. – Т. 47. – №. 3. – С. 291.
3. Hemani G. et al. MR-Base: a platform for systematic causal inference across the phenome using billions of genetic associations // *BioRxiv*. – 2016. – С. 078972.
4. Zhu Z. et al. Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets // *Nature genetics*. – 2016. – Т. 48. – №. 5. – С. 481.
5. Momozawa Y. et al. IBD risk loci are enriched in multigenic regulatory modules encompassing putative causative genes // *Nature communications*. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 2427.
6. Shadrina A. S. et al. Varicose veins of lower extremities: insights from the first large-scale genetic study // *bioRxiv*. – 2018. – С. 368365.

UDC: 575

OBTAINING NEW BIOLOGICAL KNOWLEDGE FROM THE RESULTS OF GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES USING THE GWAS-MAP PLATFORM

T. Shashkova¹, D. Gorev¹, Y. Tsepilov¹, E. Pakhomov¹, A. Torgasheva², P. Joshi³, Y. Aulchenko²

¹Novosibirsk State University, Russia, 630090, Novosibirsk, ul Pirogova, 1
e-mail: shashkova@phystech.edu

²Institute of Cytology and Genetics SB RAS

³University of Edinburgh

We present GWAS-MAP, a platform for integrating, storing and processing results of genome wide association studies. We analyzed varicose veins to demonstrate the platform application as an approach for extracting new

biological knowledge and establishing mechanistic hypotheses. The results confirmed known epidemiological associations for disease and let us hypothesise that increased levels of MICB and CD209 proteins in human plasma may increase susceptibility to the varicose veins.

Key words: genomics, genome-wide association study, GWAS, database, quantitative and computational genetics, varicose veins

Introduction.

Genome-wide association studies (GWAS) is a research methodology that has become very popular over the past decade [1]. Results of GWAS (RGWAS) are usually published as a file of summary statistics containing information about alleles and allele frequency, and characteristic of effect on phenotype for each single nucleotide polymorphism (SNP). This information could be used to address a variety of problems - from research in fundamental biology and genetics to the search for biomarkers and targets for therapeutic intervention.

While the number of GWAS collected by the scientific community is increasing, the use of the data generated is limited by the lack of generally accepted guidelines and standards. In particular, researchers face the following problems. First of all, RGWAS present a huge amount of data that requires a special infrastructure. Secondly, in addition to storing the primary data, it is necessary to preprocess it. Thirdly, the same type of data is generated in different laboratories using different protocols, which requires an integration procedure to ensure universal usability. Finally, it is necessary to develop user interfaces that would allow researchers, many of whom may be non-expert in information technologies, to work with RGWAS.

To help address these issues, we developed the GWAS-MAP platform for storing, processing, and analysis of RGWAS. The system provides an opportunity to carry out research that will contribute to the search for new biomarkers and therapeutic approaches. We have analyzed varicose veins as an example to demonstrate our approach.

Results.

Architecture of GWAS-MAP platform.

The GWAS-MAP platform consists of a database (DB) and three data processing modules: integration, quality control (QC) and RGWAS analysis (Figure 1). Integration involves converting RGWAS, collected from different available open sources, into a universal format. After integration, we perform QC and if the RGWAS passes tests, we keep it in the database.

The DB is a part of the platform that provides a single interface to access integrated GWAS data. The DB consists of two components, each of which is controlled by its own DB management system (DBMS). The first component is controlled by the Clickhouse DBMS, which provides us with rapid-access storage of RGWAS accessible via powerful and flexible interface. Each record is parameters of SNP association in a certain GWAS. The second component is managed by the PostgreSQL DBMS and contains information about the study design, results of analyzes and other supporting information.

Analysis of RGWAS is performed by a set of platform-integrated analytical tools written in Python and available through command line interface.



Fig. 1. GWAS-MAP platform architecture scheme.

Integration of RGWAS.

The platform allows users to upload original RGWAS data (file of summary statistics). Since the GWAS data is generated in different laboratories using different protocols, the resulting summary statistics files can be presented in different formats and contain different columns. To solve this problem, we developed an integration module that transforms data into universal format. The result of the integration is a file of strictly defined structure. To ensure consistency of data within the system, information about the SNP identification number, its position in the genome, alleles and allele frequencies is compared with data from the reference sample (hereinafter referred to as "reference"). At the moment we use the reference that consist of 507 genomes of Europeans, obtained during the "1000 genomes" project (1000G phase 3 version 5). If a RGWAS does not contain all columns that are required for conversion to the universal format, these fields may be filled from the reference or calculated from the information provided in the file. For example, it is possible to restore z-statistics if an original file contains estimation of the allele effect and the mean square error of the effect.

GWAS quality control.

A necessary procedure before uploading the RGWAS to the database is QC. As our experience shows, the QC procedure is indispensable not only in meta-analysis for GWAS, but also to verify quality individual studies, since seemingly minor errors in the data provided can lead to significant false results of further analyzes. In our system, the QC module was developed to identify specific SNPs with characteristics different from those expected, as well as assess the quality of GWAS on the whole.

In particular, QC includes a comparison of the frequencies of alleles from the GWAS with these from the reference sample, a comparison of the p-values provided in the study and these calculated from the presented z-statistics, an analysis of the distribution of estimates of the allele effects, the calculation of the trait variance and genomic control factor (λ GC). SNPs with deviations of the characteristics from those expected by more than a threshold value, are marked as outliers, and, at the user's request, can be excluded from further analyzes.

Methods of RGWAS analysis implemented in the system

The system incorporates widely used methods of RGWAS analysis. These methods are focused on identification of functional variants, genes, molecules, and traits that may be potential targets of therapeutic manipulation. In particular, the system allows data processing using the following methods:

Linkage Disequilibrium score regression is a method for assessing the SNP-heritability of a trait and calculating genetic correlations between two traits [2].

Mendelian randomization methods - a set of tests that allow hypothesise a causal relationship between pair of traits [3].

Summary-level mendelian randomization (SMR) and heterogeneity in dependent instruments (HEIDI) are tests allowed to distinguish that two different traits have the same functional variant in the locus or are controlled by two different functional variants in linkage disequilibrium. The HEIDI test requires, in addition to GWAS, the information about the structure of linkage disequilibrium as input [4].

Dimitrieva-Georges Theta - is an alternative to HEIDI. This method evaluates the similarity of association profiles based on summary statistics only. This method is preferable if there is no linkage disequilibrium data corresponding to the compared studies of traits [5].

The latter two methods are used, for example, to prioritize genes associated with a locus, by comparing patterns of gene expression associations and the trait of interest.

Database content

Currently, the GWAS DB contains in total data from 3,795 genome-wide scans with about 8,5 billions of trait-associations pairs. More specifically, 2,452 scans are coming from the UK BioBank studies, 123 - metabolomics, 1,206 - proteomics. To ensure convenient usage of GWAS data, the system also contains key information about each study, for example, date of publication, reference, and details of the experiment.

Varicose Vein Analysis

Varicose veins (VV) is one of the clinical manifestations of chronic venous disease, representing both a cosmetic and a medical problem. We demonstrate the results of a large-scale study of VV, performed on the available genetic data using the GWAS-MAP platform [6], as an example of the presented approach. The analysis of genetic correlations confirmed known positive etiological correlations between VV and height and weight, as well as such traits as deep vein thrombosis, smoking, pain, and the number of surgeries. In addition, we founded negative genetic correlations of VV with fluid intelligence score and level of education attainment. Moreover, it was demonstrated that deep vein thrombosis and VV have common functional genomic variants that are not associated with the other factors mentioned above. A causal relationship was established between VV and anthropometric features, such as height, waist size, hip circumference and weight (both for fat and fat-free mass), as well as levels of MICB and CD209 proteins in human plasma (Figure 2). Increased values of these factors lead to an increased risk of VV. At the same time, we also demonstrates that the CD209 protein can mediate the link between the polymorphism

of ABO gene and VV, as well as between VV and blood group A. Both proteins are involved in innate and adaptive immunity, which is consistent with the known role of inflammatory processes in VV progression.

In the course of this work, we developed the GWAS-MAP platform for storing and processing GWAS data. At the moment, the system's database contains data on about 4000 GWAS scans with 8,5 billions of trait-associations pair. The system interface provides a universal way of working with data, which allows developers to quickly embed new methods of analysis into the system. Users can work with the system through command-line utilities, with the help of which they can upload data to the system, run analyzes and get their results. Analysis of varicose veins demonstrated the potential of the system for formulating new biological hypotheses, such as the postulated causal relationship between the levels of MICB and CD209 proteins in human plasma and varicose veins.

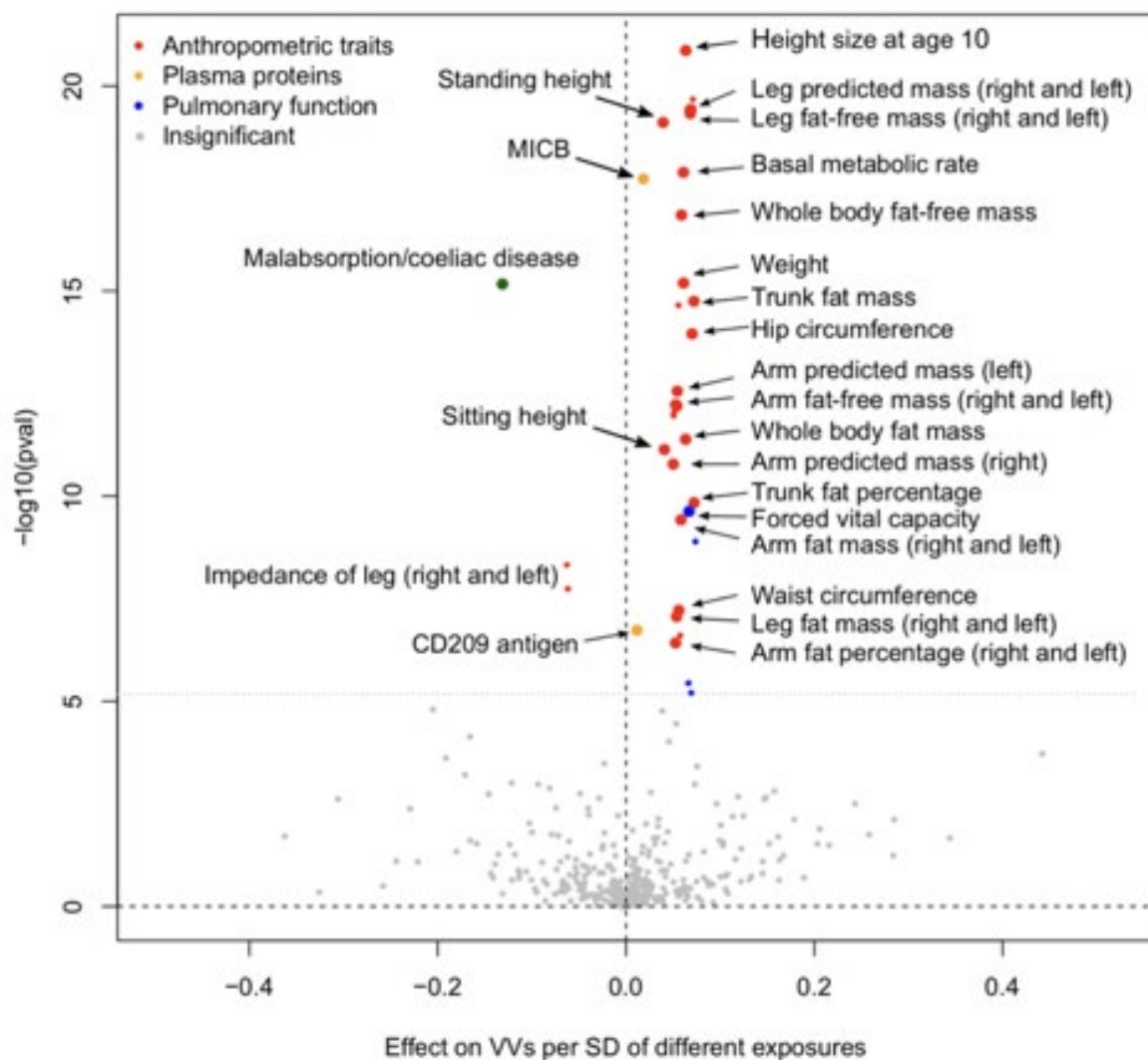


Fig. 2. "Volcano" plot showing the results of an analysis of causal relationships between VV and its risk factors using Mendelian randomization. The X-axis shows the values of the effects of the traits on VV, obtained by the method of inverse variance weighted, Y-axis - minus logarithm of the level of statistical significance of the effect.

The development of GWAS-MAP platform was supported by grants from Institutional Links Programme for Novosibirsk State University and University of Edinburgh (Project reference No IL4277322879) (TS, DG, PJ), from the Russian Ministry of Science and Education under the 5-100 Excellence Programme (YP, YT). YA was supported by the Federal Agency of Scientific Organizations via the Institute of Cytology and Genetics (project #0324-2019-0040).

References:

1. Visscher P. M. et al. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation // *The American Journal of Human Genetics*. – 2017. – T. 101. – №. 1. – C. 5-22.
2. Bulik-Sullivan B. K. et al. LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide

- association studies //Nature genetics. – 2015. – Т. 47. – №. 3. – С. 291.
3. Hemani G. et al. MR-Base: a platform for systematic causal inference across the phenome using billions of genetic associations //BioRxiv. – 2016. – С. 078972.
4. Zhu Z. et al. Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets //Nature genetics. – 2016. – Т. 48. – №. 5. – С. 481.
5. Momozawa Y. et al. IBD risk loci are enriched in multigenic regulatory modules encompassing putative causative genes //Nature communications. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 2427.
6. Shadrina A. S. et al. Varicose veins of lower extremities: insights from the first large-scale genetic study //bioRxiv. – 2018. – С. 368365.

УДК: 544.165, ББК: 28.070

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА "БОЛЬШИХ ДАННЫХ" ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ АНТИ-ВИЧ СОЕДИНЕНИЙ

П.И.Савосина¹, Л.А.Столбов², Д.С.Дружиловский², Д.А.Филимонов², В.В.Поройков²

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (РНИМУ), Россия, 117997, Москва, Островитянова, 1, e-mail: polinkasavosina@gmail.com

²Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ), Россия, 119121, Москва, Погодинская, 10, стр.8

Исследовано новое химическое пространство с более чем 283 млн. органических молекул для поиска новых лекарственно-подобных веществ с анти-ВИЧ активностью. Выявлены соединения с уже известными фармакотерапевтическими свойствами, которые подтверждены с применением 17 различных методов экспериментальной оценки анти-ВИЧ активности. Используя построенные нами SAR/QSAR модели, были отобраны ранее не исследованные соединения, согласно прогнозу, обладающие антиретровирусной активностью

Ключевые слова: Big Data; ВИЧ-1; исследование фармакотерапевтического профиля; химико-биологические взаимодействия; биоинформатика; подходы, основанные на структуре лигандов.

Введение.

На сегодняшний день ВИЧ-инфекция остается одним из самых опасных заболеваний, которое является причиной смерти около 1 млн. человек ежегодно, и несмотря на значительные успехи биомедицинской науки и фармацевтической промышленности, разработка новых препаратов для лечения ВИЧ-инфекции остается актуальной. Применение существующих лекарственных средств высокоактивной антиретровирусной терапии не обеспечивает полного излечения от ВИЧ-инфекции и сопряжено с развитием серьезных побочных эффектов, а также возникновением резистентности. До недавнего времени поиск новых активных анти-ВИЧ соединений был ограничен примерно 132 млн. уже синтезированных лекарственно-подобных органических соединений, которые представлены в базе данных PubChem. Проект консорциума американских и европейских ученых и специалистов «Synthetically Accessible Virtual Inventory» (SAVI) открывает новое химическое пространство с более чем 283 млн. органических молекул для поиска новых лекарственно-подобных веществ с анти-ВИЧ активностью. Применение компьютерных методов прогнозирования широкого спектра видов биологической активности на основе структурной формулы органического соединения, позволит отобрать из библиотеки SAVI молекулы, обладающие необходимым комплексом видов биологической активности для обеспечения терапевтического воздействия на ВИЧ-инфекцию.

Цель исследования.

Целью нашего исследования была разработка подхода для анализа in silico больших баз данных ранее не исследованного пространства классов химических соединений с целью валидации новых активных веществ с анти-ВИЧ свойствами.

Материалы и методы.

Библиотека SAVI находится в свободном доступе на сайте проекта (https://cactus.nci.nih.gov/download/savi_download/) в виде 10 файлов формата SDF. В них представлена информация о структуре, физико-химических свойствах, а также данные о «строительных блоках» и реакциях синтеза для более чем 283 млн уникальных потенциально синтезируемых химических веществ.

Для хранения конвергентной информации о химических структурах базы данных SAVI были развернуты 6 облачных MySQL серверов с использованием горизонтального масштабирования системы.

Мы использовали программный комплекс ChemAxonJChemInstant для централизованного управления развернутым массивом данных, что обеспечило высокую скорость получения, обработки и обновления исследуемого пространства химической информации, представленной в SAVI.

Для оценки библиотеки SAVI как источника новых активных соединений с анти-ВИЧ активностью была выбрана свободно доступная база данных PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), которая содержит информацию о биологической активности для более чем 132 млн. лекарственных и лекарственно-подобных органических соединений.

Для прогноза спектров биологической активности (Филимонов Д.А. и др., 2014; Дружиловский Д.С. и др., 2017) на основе построенных (Q)SAR моделей и отбора из библиотеки SAVI соединений, обладающих анти-ВИЧ свойствами и не выявленных в пересечении со структурами БД PubChem, мы применили компьютерную программу PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). результатом прогноза которой представляется как вероятности Pa («to be active») и Pi («to be inactive»).

Результаты.

Мы разработали алгоритм сравнения структур двух библиотек на основе системы представления структурной формулы в кодах SMILES. Проанализировав пересечение SAVI со структурами БД PubChem, которое составило около 0,03%, мы идентифицировали соединения, уже протестированные против ВИЧ. Активность данных соединений была подтверждена с использованием 17 различных методов экспериментальной оценки анти-ВИЧ активности. Мы отобрали из БД PubChem все вещества, которые были протестированы с помощью данных методов и на основе структурных формул 5185 отобранных активных веществ были созданы обучающие выборки для построения (Q)SAR моделей.

На основе сравнения прогноза искомых видов биологической активности мы отобрали 10 соединений, обладающих наивысшим значением Pa по двум видам биологической активности: ингибиторы интегразы и ингибиторы протеазы ВИЧ-1 (Druzhilovskiy et al., 2018).

На основе прогноза антиретровирусной активности мы отобрали из библиотеки SAVI молекулы, потенциально обладающие необходимыми фармакотерапевтическими эффектами. Полученные нами результаты позволяют рассматривать SAVI как перспективный источник новых анти-ВИЧ соединений.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ-НИН № 17-54-30015-НИЗ_а.

Литература:

1. Дружиловский Д. С., Рудик А. В., Филимонов Д. А., Глориозова Т. А., Лагунин А. А., Дмитриев А. В., Погодин П. В., Дубовская В. И., Иванов С. М., Тарасова О. А., Беженцев В. М., Муртазалиева Х. А., Семин М. И., Майоров И. С., Gaur A. S., Sastry G. N., Поройков В. В. Компьютерная платформа Way2Drug: от прогнозирования биологической активности к репозиционированию лекарств. // Изв. Акад. наук. Сер. хим. – 2017. – № 10. – С. 1832-1841.
2. Дружиловский Д., Филимонов Д., Веселовский А., Беженцев В., Столбов Л., Поройков В., Никлаус М. (2018). Анализ большого химико-биологического пространства с целью поиска новых анти-ВИЧ соединений. Абстр. 256th ACS National Meeting, Август 19-23, 2018, Бостон, Массачусетс, США. COMP 151.
3. Филимонов Д. А., Лагунин А. А., Глориозова Т. А., Рудик А. В., Дружиловский Д. С., Погодин П. В., Поройков В. В. // Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS Online. Хим. гетероцикл. соед. – 2014. – № 3. – С. 483-499.

UDC: 544.165

DEVELOPMENT OF METHODS FOR BIG-DATA ANALYSIS TO DISCOVER NEW ANTI-HIV COMPOUNDS

P.Savosina¹, L.Stolbov², D.Druzhilovskiy², D.Filimonov², V.Poroikov²

¹Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Russia, 117997, Moscow, Ostrovitianov, 1
e-mail: polinkasavosina@gmail.com

²Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 10, build. 8

The new chemical space with over 283 million organic molecules was studied to find new drug-like compounds with anti-HIV activity. We identified the compounds with already known pharmacotherapeutic properties, which anti-HIV activity was confirmed by 17 methods. Using SAR/QSAR models, we selected previously unexplored compounds with potential antiretroviral action.

Key words: Big Data; HIV-1; investigation of pharmacotherapeutic profiles; chemical-biological interactions; bioinformatics; ligand-based drug design.

Introduction.

Today HIV-infection is one of the most dangerous disorder that caused millions of death each year. Despite the significant progress in biomedical science and pharmaceutical industry, development of new drugs for the treatment of HIV-infection is still very important. The application of existing highly active antiretroviral therapy does not provide the complete curation of HIV infection treatment causes the severe side effects as well as leads to the emergence of resistance. To date, the procedure of a new active anti-HIV compounds discovery is restricted by about 132 million already synthesized drug-like organic compounds included in the PubChem database. Consortium «Synthetically Accessible Virtual Inventory» (SAVI) created by American and European scientists from both academy and industry has generated library representing new chemical space with over 283 million organic drug-like molecules suitable to search for new anti-HIV agents. Application of computer-aided prediction of biological activity spectra for substances based on structure-activity relationships allows selecting molecules with the required biological activity profiles for HIV-infection therapy.

The purpose of research.

The purpose of this study is an implementation of in silico approach aimed to analyze previously unexploited big chemical database to find new active substances with anti-HIV action.

Materials and methods.

The SAVI library is freely available on web site (https://cactus.nci.nih.gov/download/savi_download/) as ten SD-files, which contain the structural formulae, physical-chemical properties, building blocks and synthetic methods for more than 283 million unique potentially synthesizable chemical substances.

To store the convergent data of chemical structures from SAVI database we deployed 6 MySQL cloud servers using the horizontal scaling through sharding.

We used ChemAxon JChem Instant tool for management of deployed data set thus to ensure fast speed to get, processing and updating information presented in SAVI.

Freely accessible PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), which contains biological activities data for about 132 million drugs and drug-like compounds, was used to evaluate SAVI as a potential source of anti-HIV substances

We applied computer program PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) for prediction of biological activity spectra (Filimonov D.A. et al., 2014; Druzhilovskiy D.S. et al., 2017) based on built (Q)SAR models. PASS prediction results are presented as estimates the probabilities Pa («to be active») and Pi («to be inactive») and allowed to select from SAVI library anti-HIV compounds, which have not been identified by comparison with PubChem structures.

Results.

We have developed an algorithm to compare structures from two libraries using the presentation of structural formula in SMILES codes. Overlapping between SAVI structures and substances from PubChem is about 0.03%, where we identified compounds that have been already tested against HIV. The activity of these substances was confirmed by 17 experimental assays. We selected all compounds, which have been tested by these methods, from the PubChem database. Based on structural formulae of 5158 active selected substances we created the training sets for the building of (Q)SAR models.

We selected ten molecules with the highest estimated Pa for integrase HIV-1 inhibitor and protease HIV-inhibitor biological activity types (Druzhilovskiy et al., 2018).

We selected molecules with the required pharmacological profiles as potential agents for HIV-infection therapy based on the prediction of antiretroviral activity for molecules from SAVI library. These results lead to the conclusion that SAVI is a promising source of new anti-HIV agents.

The work is supported by the RFBR-NIH grant No. 17-54-30015-NIH_a.

References:

1. Druzhilovskiy D.S., Rudik A.V., Filimonov D.A., Glorizova T.A., Lagunin A.A., Dmitriev A.V., Pogodin P.V., Dubovskaja V.I., Ivanov S.M., Tarasova O.A., Bezhtentsev V.M., Murtazalieva K.A., Semin M.I., Mayorov I.S., Gaur A.S., Sastry G.N., and Poroikov V.V. (2017). Computational platform Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug repurposing. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, 66 (10), 1832-1841.
2. D. Druzhilovskiy, D. Filimonov, A. Veselovsky, V. Bezhtentsev, L. Stolbov, V. Poroikov, M. Nicklaus (2018). Analysis of large chemical-biological space aimed at discovery of novel anti-HIV agents. *Abstr. 256th ACS National Meeting*, August 19-23, 2018, Boston, Massachusetts, USA. COMP 151.
3. Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2014, 50: 444-457.

УДК 579.254.26

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СИСТЕМ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ В ОБРАЗЦАХ ИЗ МИРОВОГО ОКЕАНА

М. Хачатурян¹, И. Русинов², А. Ершова^{2,3}
¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия, Ленинские горы 1с40

²Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

³Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia

e-mail: m.a.khachatryan@yandex.ru

Анализ распределения 9569 генов систем рестрикции-модификации, найденных в 29 глубоких и 106 поверхностных образцах Tara Ocean, показал существенное различие глубоких и поверхностных микробиомов в стратегии защиты от вирусов.

Ключевые слова: системы рестрикции-модификации, морские микробиомы, горизонтальный перенос генов

Бактерии и археи используют различные системы для защиты от вирусов. Системы рестрикции-модификации (Р-М) и CRISPR/Cas – наиболее исследованы, однако сейчас известно множество систем генов, предположительно защищающих прокариот от вирусов [1]. Распределение и устойчивые сочетания защитных систем в природных микробиомах мало изучены. Целью данной работы было изучение распределения систем Р-М в морских метагеномных образцах.

Проект Tara Ocean [2] был выбран как самый большой проект морских микробиомов, включающий сотни образцов со всего Мирового океана, собранных с различных глубин. Данная работа использует прокариотический подпроект (ERP001736) из 29 глубоких (>200м) образцов (7760 Мб данных) и 106 поверхностных (<200м) образцов (36324 Мб данных).

Количественный таксономический анализ показал, что образцы из неосвещенного глубокого (>200 м) и освещенного поверхностного слоя похожи сами на себя, но не похожи друг на друга. С другой стороны, по системам Р-М образцы глубокого слоя значительно отличаются и от поверхностных образцов, и между собой, а поверхностные между собой похожи, независимо от того, в какой части Мирового океана они были собраны (Рис. 1). Мы предполагаем, что поверхностный слой постоянно перемешивается, причем быстрее, чем меняется набор систем Р-М, в то время как глубокие сообщества более изолированные друг от друга, и как следствие, имеют более постоянный состав.

Рис. 1: Корреляции между метагеномами (одна строка – один метагеном) демонстрируют разницу между глубокими и поверхностными сообществами по родам (А) и по системам Р-М (Б).

Хотя средний размер метагенома и меньше для глубоких образцов, среднее разнообразие систем Р-М в них оказалось на 40% выше, чем в поверхностных (53 против 38). Среднее нормированное количество найденных генов систем Р-М для глубоких метагеномов также выше, на 65% (33 против 20).

На основе обнаруженных различий была выдвинута гипотеза, что различия в изменчивости сообщества приводят к различиям в защитных стратегиях: поверхностные сообщества используют стандартный набор систем Р-М, от которых некоторые вирусы оказываются защищены, но не все. Глубокие сообщества, напротив, в силу постоянства набора вирусов, делают ставку на гонку вооружений: когда вирусы становятся невидимы для некоторых систем, их набор меняется на более эффективные. Это может объяснить большее разнообразие систем Р-М в глубоких сообществах.

Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований № 18-34-00860.

Литература:

1. Doron S. et al. //Science. – 2018. – Т. 359. – №. 6379. – С. 4120.
2. Pesant S. et al. //Scientific data. – 2015. – Т. 2. – С. 150023.

UDK 579.254.26

DISTRIBUTION OF RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEMS GENES IN SAMPLES OF THE WORLD OCEAN

M. Khachatryan¹, I. Rusinov², A. Ershova^{2,3}

¹Faculty of bioengineering and bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

²Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

³Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia

e-mail: m.a.khachatryan@yandex.ru

Restriction-modification systems distribution was studied in 29 deep and 106 surface prokaryotic samples from Tara Ocean. Calculations based on 9569 detected genes show significant differences between deep and surface communities in defense strategies.

Key words: restriction-modification systems, ocean microbiome, horizontal gene transfer

Bacteria and archaea use several genes systems to protect themselves from phages. Restriction-modification (R-M) systems and CRISPR/Cas are the best investigated, but [1] found a lot of various defensive genes with known and unknown protective mechanisms. Distribution and stable combinations of defensive systems in natural prokaryotic communities are also not studied well. Our goal is to compare distribution of R-M systems in marine metagenomic samples.

To our work Tara Ocean project [2] was chosen, because it is the largest marine microbiome project, which includes hundreds of samples from all over the World Ocean with different filters and depths. Our study is based on a prokaryotic Tara Ocean subproject <ERP001736>, which consists of 29 deep (>200m) samples (total length is 7760 Mb) and 106 surface layer (<200m) samples (total length is 36324 Mb).

The quantitative taxonomy analysis demonstrates that the samples from the dark deep layer and the photic surface layer are similar within the layer and differ between the layers. On the other hand, according to R-M systems composition, samples from deep layer differ from the surface layer and from each other, while the surface layer samples are similar all over the Global Ocean (Fig. 1). We suppose that the surface water is regularly interfusing faster than the defense systems pool changes, while the deep communities are more isolated and stable.

Fig. 1: Calculated correlations (one line one metagenome) show the difference between deep (aphotic) and surface (photic) communities according to genera (A) and R-M systems (B).

Despite the average metagenome size is lower for deep layer samples, the average diversity of R-M systems is about 40% higher than in surface layer samples (53 versus 38). The average normalized amount of detected R-M genes is about 65% higher for the deep layer as well (33 versus 20).

This observation raised a hypothesis that the difference in the communities mobility leads to differences in the defense strategies. Surface prokaryotes use a pool of standard nonspecific R-M systems, which protect from some phages, but some other become invisible for these common systems. Fast changing environment makes sophistication of defense systems senseless. At the same time, deep communities prokaryotes are exposed to more stable variety of phages, what leads to an arm race. As the phages become invisible, the pool of R-M systems changes to be effective again. It could explain large and more variable pool of R-M systems in deep communities compared to the surface.

The work was supported by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) grant no 18-34-00860.

References:

1. Doron S. et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome //Science. – 2018. – T. 359. – №. 6379. – C. eaar4120.
2. Pesant S. et al. Open science resources for the discovery and analysis of Tara Oceans data //Scientific data. – 2015. – T. 2. – C. 150023.

УДК 577.112

РОЛЬ АМИЛОИДОГЕНЕЗА В ЗАПАСАНИИ БЕЛКА В СЕМЕНАХ РАСТЕНИЙ

Нижников А.А.^{1,2}, Белоусов М.В.^{1,2}, Белоусова М.Е.¹, Косолапова А.О.^{1,2}, Штарк О.Ю.¹, Антонетт К.С.^{1,2}

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Подбельского ш., 3, Пушкин, Санкт-Петербург, 196608, Россия
Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия
e-mail: ant.nizhnikov@gmail.com

Амилоидами называют фибриллярные белковые агрегаты с особой пространственной структурой. Данные, полученные нами при помощи вычислительных и экспериментальных подходов, впервые показывают, что амилоиды образуются также при запасании белка в семенах наземных растений, и эта особенность является эволюционно консервативной.

Ключевые слова: амилоид, запасной белок, фибрилла, растение, CUPIN-1

Амилоиды это белковые фибриллы с уникальной пространственной структурой, стабилизированной межмолекулярными бета слоями, что придает им особые физико-химические свойства. Формирование таких фибрилл различными белками ассоциировано с развитием более сорока неизлечимых болезней человека и животных. Идентифицирован и целый ряд функциональных амилоидов, выполняющих жизненно важные функции у разнообразных организмов, включая архей, бактерий и эукариот. Наиболее значимой группой организмов, у которых амилоидные белки до настоящего времени идентифицированы не были, являются растения [1].

Проведенный нами при помощи программы Waltz [2] и алгоритма SARP [3] биоинформатический анализ протеомов 75 видов наземных растений, доступных в открытых базах данных и включающих около трех миллионов белков, показал, что наиболее обогащенными амилоидогенными участками белками у большинства исследованных видов являются запасные белки семян, имеющие эволюционно-консервативный домен, относящийся к суперсемейству CUPIN-1 [4]. Экспериментальное исследование, включающее протеомный анализ детергент-устойчивых белков семян, получение фибрилл in vitro и анализ их амилоидных свойств при помощи поляризационной и трансмиссионной электронной микроскопии, подтвердило их амилоидные свойства и показало, что ключевыми детерминантами амилоидогенности являются домены CUPIN-1. Таким образом, полученные нами данные впервые показывают, что амилоидогенез вовлечен в запасание белка в семенах растений.

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.

UDC 577.112

THE ROLE OF AMYLOIDOGENESIS IN THE PROTEIN STORAGE IN PLANT SEEDS

Nizhnikov A.A.^{1,2}, Belousov M.V.^{1,2}, Belousova M.E.¹, Kosolapova A.O.^{1,2}, Stark O.Yu.¹, Antonets K.S.^{1,2}

¹All-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology, Podbelskogo sh., 3, Pushkin, St. Petersburg, 196608, Russia
²St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia
e-mail: ant.nizhnikov@gmail.com

Amyloids are fibrillar protein aggregates with a specific spatial structure. Our data obtained using both computational and experimental approaches show that amyloid formation accompanies process of protein storage in the seeds of land plants, and this feature is evolutionarily conservative.

Key words: amyloid, storage protein, fibril, plant, CUPIN-1

Amyloids are protein fibrils with a unique spatial structure stabilized by intermolecular hydrogen bonds giving them special physicochemical properties. The formation of such fibrils is associated with the development of more than 40 incurable diseases of humans and animals. On the other hand, different functional amyloids perform vital functions in a variety of organisms, including archaea, bacteria and eukaryotes. The most important group of organisms in which amyloid proteins have not yet been identified are plants [1].

Using the Waltz program [2] and the SARP algorithm [3] we carried out an analysis of the proteomes of 75 species of land plants available in open access databases and containing about three million proteins, and showed that seed storage proteins with evolutionarily conservative domain belonging to the CUPIN-1 superfamily were the most enriched with amyloidogenic regions in most species of land plants [4]. An experimental study, including proteomic analysis of detergent-resistance of seed proteins, obtaining fibrils in vitro and analyzing their amyloid properties using polarization and transmission electron microscopy confirmed their amyloid properties and showed that CUPIN-1 domains are key determinants of amyloidogenicity. Thus, the data obtained for the first time show the role of amyloidogenesis in protein storage in the seeds of plants.

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.

УДК 577.21

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА MYB ЖИВОТНЫХ

Мырзабекова М.О.

Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан.
050040, Алматы, проспект Аль-Фараби 71
e-mail: moldir.myrzabek@gmail.com

Установлены количественные характеристики связывания miRNA с mRNA 23 транскрипционных факторов семейства MYB *Bos taurus*. Сайты связывания miRNA с mRNA транскрипционных факторов расположены в 5'-нетранслируемом участке, в белок-кодирующей части и в 3'-нетранслируемом участке mRNA.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, семейство MYB, транскрипционный фактор

Актуальность. Целью работы является изучение влияния miRNA на экспрессию транскрипционных факторов семейства MYB коровы (*Bos taurus*). Действие miRNAs на экспрессию генов TF животных изучено недостаточно, поэтому важно выяснить возможное влияние miRNA на экспрессию семейства MYB.

Методы. Мы находили сайты связывания miRNA в нуклеотидных последовательностях mRNA 23 генов (TADA2A, TERF1, TERF2, TTF1, ZZZ3, NCOR1, RCOR1, RCOR2, RCOR3, CDC5L, DMTF1, DNAJC2, MIER1, MIER2, MIER3, MYB, MYBL1, MYBL2, MYSM1, SMARCC2, SMARCA1, SMARCA5, TERB1) транскрипционных факторов семейства MYB *B. taurus*. Нуклеотидные последовательности TF были получены из AnimalTFDB3 (<http://www.bioguo.org/AnimalTFDB/>). В работе использовали нуклеотидные последовательности 1025 miRNA *B. taurus*, полученные из базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org>). Поиск сайтов связывания miRNA с mRNA проводили с помощью программы MirTarget. Она рассчитывает отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где ΔG_m равно свободной энергии связывания miRNA полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Программа рассчитывает и схему взаимодействия miRNA с mRNA для каждого сайта.

Результаты. Установлено, что сайты связывания miRNA с mRNA транскрипционных факторов семейства MYB *B. taurus* расположены в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR), в белок-кодирующей части

(CDS) и в 3'UTR mRNA. Сайты связывания miRNA с mRNA отобраны с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 85%. miRNA *B. taurus* имели 148 сайтов связывания с mRNA 21 генов транскрипционных факторов семейства MYB *B. taurus*. Величина $\Delta G/\Delta G_m$ изменялась от 85 до 97%. Наибольшее число сайтов связывания (21) miRNA имеет mRNA гена NCOR1, величина $\Delta G/\Delta G_m$ изменяется от 85 до 91%. На mRNA гена RCOR1 действуют 19 miRNA, величина свободной энергии взаимодействия составляет 97% от максимальной энергии связывания. На mRNA гена MIER2 действуют шестнадцать miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ от 85 до 87%. В mRNA гена MYBL2 связываются 17 miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ от 85 до 89%. В CDS mRNA генов MIER2, RCOR2, RCOR3 локализованы сайты связывания 16, 10 и 9 miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ от 85 до 91%. С mRNA генов MYB, MYBL1 связываются восемь miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ от 85 до 90%. В mRNA гена SMARCA5 связывались семь miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ от 85 до 90%. mRNA генов MYSM1, TERF2 содержали по шесть сайтов связывания miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ от 85 до 90%. В mRNA гена ZZZ3 локализованы пять сайтов связывания miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ от 86 до 89%. С mRNA генов CDC5L и MIER1 связывались только по четыре miRNA с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ от 85 до 86%.

UDC 577.21

BINDING SITES miRNA WITH mRNA GENES OF FAMILY MYB ANIMALS

Myrzabekova M.O.

al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
 050040, Almaty, avenue al-Farabi 71
 e-mail: moldir.myrzabek@gmail.com

The quantitative characteristics of miRNA binding with mRNA 23 transcription factors of the MYB family *Bos taurus* was implemented. The miRNA binding sites with mRNA transcription factors are located in the 5'-untranslated region, in the protein-coding part and in the 3'-untranslated region of mRNA.

Key words: miRNA, mRNA, family MYB, transcription factor

Aim. The aim of our work is to study the effect of miRNA on the expression of transcription factors of family MYB *Bos taurus*. The effect of miRNAs on the expression of animal TF genes is not enough studied, so it is important to determine the possible effect of miRNA on the expression of the MYB family.

Methods. We found miRNA binding sites in the mRNA nucleotide sequences of 23 genes (TADA2A, TERF1, TERF2, TTF1, ZZZ3, NCOR1, RCOR1, RCOR2, RCOR3, CDC5L, DMTF1, DNAJC2, MIER1, MIER2, MIER3, MYB, MYBL1, MYBL2, MYSM1, SMARCC2, SMARCA1, SMARCA5, TERB1) transcription factors of the MYB family *B. taurus*. The nucleotide sequences of TF were taken from AnimalTFDB3 (<http://www.bioguo.org/AnimalTFDB/>). Nucleotide sequences of *B. taurus* 1025 miRNAs were taken from the miRBase database (<http://www.mirbase.org>). The characteristics of the miRNA interaction with mRNA were identified by MirTarget program. It calculates the ratio $\Delta G/\Delta G_m$ (%), where ΔG_m is equal to the free miRNA binding energy of a fully complementary nucleotide sequence. The program calculates the miRNA interaction diagram with mRNA for each site.

Results. The miRNA binding sites with mRNA transcription factors are located in the 5'-untranslated region (5'UTR), in the protein-coding part (CDS) and in the 3'-untranslated 3'UTR region of mRNA. The miRNA binding sites with mRNA selected with the ratio $\Delta G/\Delta G_m$ equal to more than 85%. *B. taurus* miRNAs have 148 mRNA binding sites for 21 genes of the MYB family of transcription factors *B. taurus*. The largest number of binding sites (21) of miRNAs have the mRNA of the NCOR1 gene, the value of $\Delta G/\Delta G_m$ varies from 85 to 91%. For the gene RCOR1 have effect 19 miRNAs, the value of the free interaction energy is 97% of the maximum binding energy. For the gene MIER2 have effect sixteen miRNAs with a $\Delta G/\Delta G_m$ ratio of 85 to 87%. In the mRNA gene MYBL2, 17 miRNAs are associated with the $\Delta G/\Delta G_m$ ratio from 85 to 89%. In CDS mRNA of the MIER2, RCOR2, RCOR3 genes are located the binding sites of 16, 10, and 9 mRNA with the $\Delta G/\Delta G_m$ ratio from 85 to 91%. Eight miRNAs are associated with the $\Delta G/\Delta G_m$ ratio from 85 to 90% to the mRNA genes MYB, MYBL1. In mRNA of the SMARCA5 gene, seven miRNAs were associated with the $\Delta G/\Delta G_m$ ratio from 85 to 90%. The mRNA of the MYSM1, TERF2 genes each contained six miRNA binding sites with $\Delta G/\Delta G_m$ ratio of 85 to 90%. Five miRNA binding sites are located in the mRNA of the ZZZ3 gene with a $\Delta G/\Delta G_m$ ratio of 86 to 89%. Only four miRNA were associated with the mRNA of the CDC5L and MIER1 genes with a $\Delta G/\Delta G_m$ ratio of 85 to 86%.

УДК 577.322

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ СЕМЕЙСТВА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S1, СОДЕРЖАЩИХ РАЗНОЕ КОЛИЧЕСТВО СТРУКТУРНЫХ ДОМЕНОВ

Галзитская О.В., Селиванова О.М., Мачулин А.В. Дерюшева Е.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук,
142290, Пущино, Московская обл., ул. Институтская д. 4
e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

При исследовании семейства рибосомных белков S1 (1453 последовательностей) было обнаружено, что число таких доменов может рассматриваться как стабильный признак принадлежности организма к тому или иному отделу. Так у большинства представителей грамотрицательных бактерий отдела Proteobacteria белок S1 состоит из шести S1-доменов, у представителей отдела Deinococcus-Thermus из пяти. Самый маленький белок S1, состоящий только из одного S1-домена встречается у представителей отдела семейства Micoplasmatacea (M. Mobilie 116 a.o.) и Spiroplasmataceae (Sp.kunkelii 111 a.o.).

Ключевые слова: рибосомный белок, число доменов, отдел, филогения

Семейство рибосомных белков S1 составляет около 20% от всех бактериальных белков, содержащих домен S1. Важной особенностью этого семейства является наличие множества копий структурных доменов у бактерий, число которых изменяется в строго ограниченном диапазоне от одного до шести. Анализ 1453 последовательностей S1 позволил нам продемонстрировать, что количество доменов в S1 является отличительной характеристикой для филогенетической группировки бактерий в основные отделы. 1453 последовательностей S1 были идентифицированы в 25 из 30 различных отделов согласно LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). Около 62% всех записей идентифицированы как шестидоменные белки S1, которые относятся к отделу протеобактерий. Четырехдоменные S1 идентифицированы в основном в белках из отделов Firmicutes и Actinobacteria. Записи, относящиеся к этим отделам, составляют 33% всех записей. Наименее представленные - двухдоменные S1, которые составляют около 0,6% всех записей. Третий и четвертый домены, для наиболее представительного класса четырех- и шестидоменного белков S1, имеют наибольшую идентичность с доменом S1 из полинуклеотидфосфорилазы (PNPase) и доменом S1 из однодоменного S1. Кроме того, для этих групп центральная часть S1 (третий домен) является более консервативной, чем концевые домены. Проблема понимания природы белковых повторов, с соответствующей функцией для каждого повтора и их эволюции, до сих пор остается неясной. Эти повторы произошли от общего предка, который обязательно содержал один повтор. Гомо-олигомерная структура предка может отражать внутрицепочечную повторяющуюся структуру его современного гомолога. Но есть примеры гомологичных множественных повторов, которые образованы как из олигомеров с единичными повторами, так и из одной цепочки из нескольких повторов. Для исследуемых бактериальных белков максимальное количество повторов S1-домена (шесть) достаточно для выполнения всех необходимых функций. Как было показано нами, третий домен в этой группе имеет максимальную идентичность (68%) среди других доменов.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант №18-14-00321.

УДК 577.322

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CLASSIFICATION OF THE S1 RIBOSOMIC PROTEIN FAMILY CONTAINING A DIFFERENT NUMBER OF STRUCTURED DOMAINS

Galzitskaya O.V., Selivanova O.M., Machulin A.V, Deryusheva E.I

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 4 Institutskaya str., Pushchino, Moscow Region, 142290,
Russia
e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

In the study of the family of ribosomal proteins S1 (1453 sequences), it was found the number of domains in S1 is a distinctive characteristic for phylogenetic bacterial grouping in main phyla. So, for the majority of representatives of Gram-negative bacteria of the phylum Proteobacteria the S1 protein consists of six S1 domains, and for representatives of the phylum Deinococcus-Thermus it is five. The smallest protein S1, consisting of only one S1-domain, is found in members of the Micoplasmatacea family (*M. Mobilie* 116 ao) and Spiroplasmataceae (*Sp. kunkelii* 111 ao).

Key words: ribosomal protein, number of domains, department, phylogeny

The S1 ribosomal protein family accounts for about 20% of all bacterial proteins containing the S1 domain. An important feature of this family is the presence of multiple copies of structural domains in bacteria, the number of which varies in a strictly limited range from one to six. Analysis of 1453 S1 sequences allowed us to demonstrate that the number of domains in S1 is a distinctive characteristic for the phylogenetic grouping of bacteria into the main sections. 1453 S1 sequences were identified in 25 of 30 different divisions according to LPSN (List of Prokaryotic Names). About 62% of all records are identified as six-domain S1 proteins, which belong to the proteobacteria department. Four-domain S1 are identified mainly in proteins from the Firmicutes and Actinobacteria departments. Entries related to these departments make up 33% of all entries. The least represented are the two-domain S1, which constitute about 0.6% of all entries. The third and fourth domains, for the most representative class of four- and six-domain S1 proteins, have the greatest identity with the S1 domain of polynucleotide phosphorylase (PNPase) and the S1 domain of single-domain S1. In addition, for these groups, the central part of S1 (the third domain) is more conservative than the terminal domains. The problem of understanding the nature of protein repeats, with an appropriate function for each repeat and their evolution, is still unclear. These repetitions are descended from a common ancestor, which necessarily contained one repetition. The ancestor homo-oligomeric structure may reflect the intrachain recurring structure of its modern homologue. But there are examples of homologous multiple repeats, which are formed both from oligomers with single repeats, and from one chain of several repeats. For the studied bacterial proteins, the maximum number of repeats of the S1 domain (six) is sufficient to perform all the necessary functions. As we have shown, the third domain in this group has the maximum identity (68%) among other domains.

This study was supported by the Russian Science Foundation (grant number 18-14-00321).

UDC 544.165

ТРИ ДЕСЯТИЛЕТИЯ КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ PASS: ОТ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СПЕКТРОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДО СИСТЕМНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

Поройков В.В., Филимонов Д.А., Глориозова Т.А., Лагунин А.А., Дружиловский Д.С., Рудик А.В.,
Дмитриев А.В., Тарасова О.А., Иванов С.М., Погодин П.В.

Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича, Москва, Россия
 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8
 e-mail: vvp1951@yandex.ru

Рассмотрена история создания и развития компьютерной программы PASS, прогнозирующей спектры биологической активности для лекарственно-подобных соединений на основе их структурных формул. Приведены примеры практического применения разработанного нами подхода с целью идентификации наиболее перспективных органических соединений для синтеза и установления приоритетных направлений тестирования биологической активности уже синтезированных веществ.

Ключевые слова: PASS; PharmaExpert; спектр биологической активности; предсказание; виртуальный скрининг; репозиционирование лекарств; системная фармакология

Создание компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) было начато около 30 лет назад в рамках Государственной системы регистрации новых химических соединений, синтезированных в СССР (Буров Ю.В. и др., 1990). Целью этой работы было создание компьютерного метода для предсказания спектров биологической активности лекарственно-подобных молекул, относящихся к различным химическим классам.

Разработанный нами метод прогноза основан на анализе взаимосвязей структура-активность более чем для 1 миллиона веществ обучающей выборки, содержащей информацию о структурных формулах и нескольких тысячах видов биологической активности лекарственных-подобных соединений (Филимонов Д.А. и др., 2014). В программе PASS биологическая активность представлена качественным образом (активно/неактивно). Химическая структура описана в виде дескрипторов множественных атомных окрестностей (Multilevel Neighborhoods of Atoms, MNA). Алгоритм построения моделей взаимосвязи структура-активность на основе веществ обучающей выборки и прогноза активности для новых (не включённых в обучающую выборку) веществ основан на Байесовских оценках. Средняя точность прогноза, рассчитанная по скользящему контролю с исключением по одному для всех веществ обучающей выборки и всех представленных для этих веществ в обучающей выборке видов биологической активности, составляет около 95%.

Наряду с локальной версией PASS, нами реализован веб-ресурс PASS Online (<http://way2drug.com/passonline>), который используется в настоящее время ~21 000 исследователей более чем из 100 стран мира (Дружиловский Д.С. и др., 2017). Ими получено около 750 000 предсказанных спектров биологической активности для исследуемых соединений, и опубликовано более 600 работ, содержащих результаты прогноза (Филимонов Д.А. и др., 2018).

На основе программы PASS в настоящее время реализован ряд веб-сервисов, к которым реализован единый доступ (http://way2drug.com/total_ph/).

Существенное расширение функциональности веб-ресурса достигнуто в рамках реализации проекта, направленного на выявление на основе компьютерного прогноза новых терапевтических применений у зарегистрированных лекарств (<http://way2drug.com/dr>).

В настоящее время выполняется работа по поиску новых антиретровирусных соединений среди 283 миллионов структур из библиотеки потенциально синтезируемых молекул Synthetically Accessible Virtual Inventory, prepared by SAVI Consortium (https://cactus.nci.nih.gov/download/savi_download/).

С использованием разработанной нами программы PharmaExpert можно анализировать результаты прогноза PASS с целью выявления причинно-следственных взаимосвязей между биологическими активностями, установления возможных положительных и отрицательных фармакокинетических и фармакодинамических межлекарственных взаимодействий, проведения виртуального скрининга и поиска соединений с множественными механизмами фармакологического действия (Lagunin A.A. et al., 2014).

Разработанные нами системно-фармакологические подходы также позволяют прогнозировать побочные эффекты используемых в медицинской практике лекарственных препаратов и новых фармакологических веществ (Ivanov S.M. et al., 2018)..

Работа выполняется при частичной поддержке гранта РФФИ № 17-54-30015-НИЗ_a.

Литература:

1. Буров Ю. В., Корольченко Л. В., Пороиков В. В. Государственная система регистрации и биологических испытаний химических соединений: возможности для изыскания новых лекарственных препаратов. // Бюлл. Всесоюз. научн. центра по безопасности биологически активных веществ. – 1990. – № 1. – С. 4-25.
2. Дружиловский Д. С., Рудик А. В., Филимонов Д. А., Глориозова Т. А., Лагунин А. А., Дмитриев А. В., Погодин П. В., Дубовская В. И., Иванов С. М., Тарасова О. А., Беженцев В. М., Муртазалиева Х. А., Семин М. И., Майоров И. С., Gaur A. S., Sastry G. N., Пороиков В. В. Компьютерная платформа Way2Drug: от прогнозирования биологической активности к репозиционированию лекарств. // Изв. Акад. наук. Сер. хим. – 2017. - № 10. – С. 1832-1841.
3. Филимонов Д. А., Лагунин А. А., Глориозова Т. А., Рудик А. В., Дружиловский Д. С., Погодин П. В., Пороиков В. В. // Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS Online. Хим. гетероцикл. соед. –2014. – № 3. – С. 483-499
4. Филимонов Д.А., Дружиловский Д.С., Лагунин А.А., Глориозова Т.А., Рудик А.В., Дмитриев А.В., Погодин П.В., Пороиков В.В. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения // Biomed. Chem. Res. Meth. – 2018. - № 1. – С. e00004.
5. Ivanov S. M., Lagunin A. A., Rudik A. V., Filimonov D. A., Poroikov V. V. ADVERPred – web service for prediction of adverse effects of drugs. // J. Chem. Inform. Model. 2018. Vol. 58. № 1. P. 8-11.
6. Lagunin A. A., Goel R. K., Gawande D. Y., Priyanka P., Gloriozova T. A. Dmitriev A. V., Ivanov S. M., Rudik A. V., Konova V. I., Pogodin P. V., Druzhilovsky D. S., Poroikov V.V. Chemo- and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. // Nat. Prod. Rep. 2014. Vol. 31. № 11. P. 1585-1611.

UDC 544.165

THREE DECADES OF COMPUTER PROGRAM PASS: FROM PREDICTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY SPECTRA TO SYSTEMS PHARMACOLOGY

Poroikov V.V., Filimonov D.A., Glorizova T.A., Lagunin A.A., Druzhilovskiy D.S., Rudik A.V., Dmitriev A.V., Tarasova O.A., Ivanov S.M., Pogodin P.V.

*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
 119121, Moscow, Pogodinskaya str., 10, bldg. 8
 e-mail: vvp1951@yandex.ru*

The history of the creation and development of the PASS computer program, which predicts the spectra of biological activity for drug-like compounds based on their structural formulas, is considered. Examples are given of the practical application of the proposed approach in order to identify the most promising organic compounds for the synthesis and to establish priority areas for testing the biological activity of already synthesized substances.

Key words: PASS; PharmaExpert; biological activity spectra; prediction; virtual screening; drug repositioning; systems pharmacology

PASS development started thirty years ago in the framework of the National System for Registration of New Chemical Compounds Synthesized in the USSR (Burov Yu. V., 1990). The project aimed to create a computational method that predicts biological activity spectra for drug-like molecules belonging to different chemical classes.

The method of prediction is based on the analysis of structure-activity relationships of the training set included more than one million molecules with information about their structural formulae and several thousand kinds of biological activity of drug-like compounds (Filimonov D. A. et al., 2014).

The categorical description of biological activity as "active" or "inactive" is used in the PASS program. The chemical structure is represented by the set of descriptors of multilevel neighborhoods of atoms, MNA. The algorithm for constructing models of the structure-activity relationship based on the compounds from the training set and prediction of activity for new compounds is based on the Bayesian estimates. The average prediction accuracy calculated by the leave-one-out cross-validation procedure for the whole training set and all represented in its types of biological activity is about 95%.

Both local PASS version and freely available via Internet web resource PASS Online are available (<http://way2drug.com/passonline>). PASS Online is currently used by ~21,000 researchers from more than 100 countries of the world (Druzhilovskiy D. S. et al., 2017). Over 750,000 predictions obtained and more than 600 papers published, where predictions are used to select the most promising molecules for synthesis and appropriate bioassays (Filimonov D. A. et al., 2018).

Based on PASS we created different web services integrated under a single umbrella (http://way2drug.com/total_ph/).

Significant PASS extension aimed to adapt its functionality for drug repurposing projects (<http://way2drug.com/dr/>), where one may estimate the biological activities for approved drugs and determine the auspicious new clinical indications.

Currently, PASS is applied to identify novel ant-HIV agents among the 283 million molecules included in the Synthetically Accessible Virtual Inventory, prepared by SAVI Consortium (https://cactus.nci.nih.gov/download/savi_download/).

Using our program PharmaExpert one may analyze PASS predictions in order to identify the relationships between biological activities, establish possible positive and negative pharmacokinetics and pharmacodynamics interactions, perform virtual screening and search for compounds with multiple mechanisms of pharmacological action (Lagunin A.A. et al., 2014).

Based on PASS estimates the systems pharmacology approach allows predicting the adverse effects of drugs used in medical practice and new pharmacological agents understudies (Ivanov S.M. et al., 2018).

This work is partially supported by the RFBR grant № 17-54-30015-NIH_a.

References:

1. Burov Yu. V., Poroikov V. V., Korolchenko L. V. National system for registration and biological testing of chemical compounds: facilities for new drugs search. // Bull. Natl. Center for Biologically Active Compounds. 1990. № 1. P. 4-25.
2. Druzhilovskiy D. S., Rudik A. V., Filimonov D. A., Glorizova T. A., Lagunin A. A., Dmitriev A. V., Pogodin P. V., Dubovskaya V. I., Ivanov S. M., Tarasova O. A., Bezhtentsev V. M., Murtazalieva K. A., Semin M. I., Maiorov I. S., Gaur A. S., Sastry G. N., Poroikov V. V. Computational platform Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug

repurposing. *Rus. Chem. Bull., Int. Ed.* 2017. Vol. 66. № 10. P. 1832-1841.

3. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Rudik A. V., Druzhilovskiy D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Prediction of biological activity of organic compounds using web-resource PASS Online. *Chem. Heterocycl. Compnds.* 2014. № 3. P. 483-499.

4. Filimonov D. A., Druzhilovskiy D. S., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Rudik A. V., Dmitriev A. V., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitations. // *Biomed. Chem. Res. Meth.* 2018. № 1. P. e00004.

5. Ivanov S. M., Lagunin A. A., Rudik A. V., Filimonov D. A., Poroikov V. V. ADVERPred – web service for prediction of adverse effects of drugs. // *J. Chem. Inform. Model.* 2018. Vol. 58. № 1. P. 8-11.

6. Lagunin A. A., Goel R. K., Gawande D. Y., Priyanka P., Glorizova T. A., Dmitriev A. V., Ivanov S. M., Rudik A. V., Konova V. I., Pogodin P. V., Druzhilovsky D. S., Poroikov V. V. Chemo- and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. // *Nat. Prod. Rep.* 2014. Vol. 31. № 11. P. 1585-1611.

УДК 577.21

ХАРАКТЕРИСТИКА САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA-5P И miRNA-3P С mRNA ГЕНА RTL1

Юрикова О.Ю., Атамбаева Ш.А.

НИИ проблем биологии и биотехнологии, Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

050040, Алматы, пр. аль-Фараби 71

e-mail: oksanayurikova@mail.ru

В CDS mRNA гена RTL1 выявлены пять пар полностью комплементарных сайтов связывания десяти miRNA. Установлены консервативные сайты связывания десяти miRNA в mRNA ортологичных генов RTL1. Эти miRNA имеют сайты связывания в mRNA 32 генов, участвующих в развитии социально значимых заболеваний.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, RTL1, ортологичный ген, сайт связывания

miRNA - малые некодирующие RNA, которые подавляют экспрессию генов на посттрансляционном уровне. Некоторые miRNA животных транскрибируются как антисмысловые последовательности к экзонам некодирующих или кодирующих белок генов [1]. Предсказание сайтов связывания miRNA проводили программой MirTarget, которая определяет следующие характеристики: а) начало сайта связывания miRNA с mRNA; б) локализация сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA; в) свободная энергия гибридизации, которая оценивается для всей нуклеотидной последовательности miRNA; и г) схемы нуклеотидных взаимодействий между miRNA и mRNA. В CDS mRNA гена RTL1 выявлены пять пар полностью комплементарных сайтов связывания miR-127-5p и miR-127-3p, miR-136-5p и miR-136-3p, miR-431-5p и miR-431-3p, miR-432-5p и miR-432-3p, miR-433-5p и miR-433-3p. Ранее экспериментально были установлены семь сайтов связывания [2]. Эти miRNA могут связываться с mRNA гена RTL1 и подавлять его экспрессию, возможно, действуя как siRNA. Полностью комплементарные сайты связывания пяти пар miRNA-5p и miRNA-3p имеются в mRNA ортологичных генов RTL1 многих видов млекопитающих. Олигопептиды QPSSDGSD и SEPSELQ, кодируемые сайтами связывания miR-127-3p и miR-127-5p, консервативны в ортологичных белках RTL1 42 видов животных. Олигопептиды DSFETMM и PSSKQME кодируемые сайтами связывания miR-136-3p и miR-136-5p идентичны в белках RTL1 39 видов животных. Сайты связывания miR-431-3p и miR-431-5p кодируют консервативные олигопептиды EALQDDL и HDGLQD в белках RTL1 у 34 видов животных. Сайты связывания miR-432-3p и miR-432-5p кодируют консервативные олигопептиды DMEEPSS и PPNDLLQ в RTL1 белке у 38 видов животных. Олигопептиды NTEEPIMI и NNDRLTV, кодируемые в белке RTL1 сайтами связывания miR-433-3p и miR-433-5p консервативны у 40 видов животных. Таким образом, олигопептиды, кодируемые сайтами связывания miRNA-5p и miRNA-3p пар консервативны. Аминокислоты, фланкирующие эти олигопептиды вариабельны. Следовательно, сайты связывания miRNA-3p и miRNA-5p в mRNA RTL1 эволюционно древние и сохраняются в течение десятков миллионов лет. Все сайты связывания для пяти пар miRNA в гене RTL1 расположены приблизительно равномерно по длине mRNA. Полученные результаты показывают, что изучение влияния miRNA на RTL1 у животных является адекватным, поскольку miRNA и их сайты связывания в mRNA практически идентичны у изученных видов животных.

С помощью программы MirTarget было предсказано более 30 генов, являющихся предполагаемыми мишенями miRNA, кодируемых RTL1. Таким образом, miRNA-3p и miRNA-5p, помимо подавления экспрессии гена RTL1, могут также регулировать трансляцию и других mRNA, вовлеченных в развитие онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и других заболеваний. Следовательно, биологическая значимость miRNA, кодируемых RTL1 велика и требуется дальнейшая валидация предполагаемых сайтов связывания.

Литература:

1. Wang J., Li Z., Liu B., et al. Systematic study of cis-antisense miRNAs in animal species reveals miR-3661 to target PPP2CA in human cells// RNA. 2016. Vol. 22. №1. P.87-95.
2. Davis E., Caiment F., Tordoir X., Cavallé J., Ferguson-Smith A., Cockett N. et al. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus// CurrBiol. 2005. Vol. 15. №8. P.743-749.

UDC 577.21

CHARACTERISTICS OF THE BINDING SITES OF miRNA-5P AND miRNA-3P WITH mRNA OF RTL1 GENE

Yurikova O.Yu., Atambayeva Sh.A.

*SRI of biology and biotechnology problems, Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
050040, al-Farabi 71, Almaty, Kazakhstan
e-mail: oksanayurikova@mail.ru*

The CDS of the RTL1 mRNA contains five pairs of completely complementary binding sites for ten miRNAs. Conserved binding sites of ten miRNAs in mRNA of orthologous RTL1 genes have been established. These miRNAs have binding sites in mRNAs of 32 genes that are involved in the development of socially significant diseases.

Key words: miRNA, mRNA, RTL1, orthologous gene, binding site

miRNAs are small non-coding RNAs that suppress gene expression at the post-translational level. Some animal miRNAs are transcribed as antisense to exons of non-coding or protein-coding genes [1]. The prediction of miRNA binding sites was carried out by the MirTarget program, which defines the following features of binding: a) the origin of initiation of miRNAs binding to mRNAs; b) the localization of the miRNA binding sites in 5'UTRs, CDSs and 3'UTRs of mRNAs; c) the free energy of hybridization, which is evaluated for the entire nucleotide sequence of miRNAs; and d) the schemes of nucleotide interactions between miRNAs and mRNAs. We have established that the CDS of the RTL1 mRNA contains five pairs of completely complementary to mRNA binding sites for miR-127-5p and miR-127-3p, miR-136-5p and miR-136-3p, miR-431-5p and miR-431-3p, miR-432-5p and miR-432-3p, and miR-433-5p and miR-433-3p. Seven of these 10 miRNAs binding sites in the mRNA of RTL1 have been previously identified [2]. These miRNAs can bind to the mRNA of the RTL1 gene and suppress its expression, possibly by acting as siRNAs. Five miRNA-5p and miRNA-3p pairs have completely complementary binding sites in the orthologous RTL1 genes of many mammalian species. The oligopeptides QPSSDGSD and SEPSELQ encoded by miR-127-3p and miR-127-5p binding sites are conserved in orthologous RTL1 proteins in 42 animal species. The oligopeptides DSFETMM and PSSKQME encoded by the miR-136-3p and miR-136-5p binding sites are identical in the RTL1 proteins of 39 animal species. The binding sites of miR-431-3p and miR-431-5p encode the conserved EALQDDL and HDGLQD oligopeptides in all RTL1 proteins of 34 animal species. The binding sites of miR-432-3p and miR-432-5p encode the conserved oligopeptides DMEEPSS and PPNDLLQ in all RTL1 proteins of 38 animal species. The oligopeptides NTEEPIMI and NNDRLTV encoded by the miR-433-3p and miR-433-5p binding sites are conserved in the RTL1 proteins of 40 animal species. Thus, oligopeptides encoded by the miRNA-5p and miRNA-3p pairs are conserved. The amino acids outside of these oligopeptides and between them are variable. Therefore, the binding sites of miRNA-3p and miRNA-5p in the RTL1 mRNA are evolutionarily ancient and have been preserved for tens of millions of years. All of the binding sites for the five miRNA pairs in the RTL1 gene are located approximately evenly along the length of the mRNA. The obtained results show that studying the effects of miRNAs of RTL1 in animal subjects is adequate, since the miRNAs and their binding sites in the mRNAs are almost identical in the studied animals.

Using MirTarget program more than 30 genes were predicted as putative target genes of miRNAs encoded by RTL1. Therefore, miRNA-3p and miRNA-5p, in addition to suppressing the expression of RTL1 gene, can also regulate the translation of mRNAs of genes involved in the development of oncological, cardiovascular, neurodegenerative and other diseases. Consequently, the biological significance of the miRNAs encoded by the RTL1 is great and further validation of putative targets is needed.

References:

1. Wang J., Li Z., Liu B., et al. Systematic study of cis-antisense miRNAs in animal species reveals miR-3661 to target PPP2CA in human cells// RNA. 2016. Vol. 22. №1. P.87-95.
2. Davis E., Caiment F., Tordoir X., Cavaillé J., Ferguson-Smith A., Cockett N. et al. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus// CurrBiol. 2005. Vol. 15. №8. P.743-749.

УДК 577.21

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ РАКА ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

Акимниязова А.Н.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан
050038, Алматы, пр. аль-Фараби, 71
e-mail: akimniyazova@gmail.com

Установлены сайты связывания miRNA с mRNA генов-кандидатов рака тонкого кишечника, которые расположены в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA этих генов. Идентифицированы кластеры сайтов связывания miRNA. Результаты исследования рекомендуются для разработки методов ранней диагностики рака тонкого кишечника.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, ген, рак тонкого кишечника

Важную роль в регуляции онкогенов играют miRNA. Во всем мире разрабатываются молекулярные не инвазивные методы ранней диагностики рака желудочно-кишечного тракта на основе анализа в крови изменений концентрации метаболитов, белков, ДНК, miRNA и др. Предсказание сайтов связывания miRNA в mRNA генов-кандидатов необходимы при разработке методов ранней диагностики онкологических заболеваний.

Для данной работы из Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) были отобраны mRNA 40 генов-кандидатов рака тонкого кишечника. Поиск генов-мишеней для miRNA проводили с помощью программы MirTarget. Программа определяет начало сайтов связывания miRNA с mRNA; расположение сайтов связывания в 5'UTR, CDS, 3'UTR; свободную энергию гибридизации (ΔG) и схемы взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA.

Сайты связывания miRNA рассматривали при отношении $\Delta G/\Delta G_m$ равном более 86%. Установлено, что 12 из 40 изученных mRNA генов не имеют сайтов связывания с 3707 miRNA [1]. Выявлены mRNA генов ASXL1 и GNAS, которые имеют полностью комплементарные сайты связывания с miRNA. в 5'UTR mRNA большинства генов, обнаружены участки содержащие два и более сайтов связывания miRNA с наложением их нуклеотидных последовательностей (кластеры). mRNA гена ASXL1 имеет кластер сайтов связывания с 172 нт по 196 нт общей длиной 25 нт и со значением свободной энергии взаимодействия ΔG равным -128 kJ/mole. mRNA гена ARID1A имеет два кластера сайтов связывания в 5'UTR со средним значением ΔG равным -126 kJ/mole и -115 kJ/mole. mRNA гена GNAS содержит кластер сайтов связывания с 30 нт по 69 нт со средней свободной энергией взаимодействия, равной -107 kJ/mole. mRNA генов SOAT1 и SOX9 имеют сайты связывания для одиночных miRNA.

В CDS mRNA гена ARID1A были обнаружены три кластера сайтов связывания miRNA со средним значением ΔG равным -129, -128 и -127 kJ/mole что выше среднего значения свободной энергии взаимодействия всех сайтов в CDS. Наличие таких кластеров сайтов связывания свидетельствует о сильной зависимости экспрессии этого гена от каждой из этих miRNA. Образование кластера сайтов связывания гена ARID1A приводит к возникновению конкуренции за сайт связывания. Четыре miRNA имеют сайты связывания в mRNA гена MUC5AC. Все сайты связывания имеют одинаковое значение $\Delta G/\Delta G_m$, равное 90% и относительно равное значение ΔG . TJU_CMC_MD2.ID00967.5p-miR длиной 22 нт имеет несколько сайтов связывания в mRNA гена MUC5AC с $\Delta G = -115$ kJ/mole. mRNA гена MUC6 имеет 5 сайтов связывания в CDS. Более высокое значение ΔG наблюдается в ассоциации с TJU_CMC_MD2.ID02888.5p-miR ($\Delta G = -121$ kJ/mole).

В 3'UTR mRNA гена MLL2 выявлен кластер сайтов связывания с 17780 нт по 17820 нт с общей длиной равной 40 нт и средним значением свободной энергией взаимодействия равной -118 kJ/mole. Были обнаружены множественные сайты связывания TJU_CMC_MD2.ID00470.5p-miR в 3'UTR mRNA генов CDKN2B и SMAD4 со средним значением ΔG равным -108 kJ/mole и значением $\Delta G/\Delta G_m = 89\%$.

Результаты этого исследования продемонстрировали, что miRNA могут осуществлять регуляцию экспрессии генов в 5'UTR, CDS и 3'UTR. Полученные результаты могут служить основой для разработки новых диагностических маркеров и терапевтических мишеней для пациентов с раком тонкого кишечника.

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. E1106-E1115.

UDC 577.21

CHARACTERISTICS OF miRNAS INTERACTION WITH mRNAs OF CANDIDATE GENES IN SMALL INTESTINAL CANCER

Akimniyazova A.N.

*al-Farabi Kazakh Natinal University, Almaty, Kazakhstan
050038, Almaty, al-Farabi ave., 71
e-mail: akimniyazova@gmail.com*

There were established miRNA binding sites in mRNA of candidate genes in small intestinal cancer, located in 5'UTR, CDS and 3'UTR mRNA of these genes. The clusters of miRNAs binding sites were identified. The results of the study are recommended for the development of methods for early diagnosis of small intestinal cancer

Key words: miRNA, mRNA, gene, small intestinal cancer

miRNAs plays an important role in regulation of oncogenes. Molecular non-invasive methods for the early diagnosis of gastrointestinal tract cancer are being developed around the world based on an analysis of changes in the concentration of metabolites, proteins, DNA, miRNA and others in the blood. Prediction of miRNA binding sites in mRNA candidate genes is necessary in order to develop methods for the early diagnosis of oncological diseases.

For this work, mRNAs of 40 small intestinal cancer candidate genes were selected from Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Search for miRNAs' target genes was performed using the MirTarget program. The program determines the start of miRNA binding sites with mRNA; location of binding sites in 5'UTR, CDS, 3'UTR; free energy of hybridization (ΔG) and miRNA-mRNA nucleotide interaction schemes.

miRNAs binding sites were considered at a $\Delta G/\Delta G_m$ ratio of more than 86%. It was established that 12 of the 40 studied mRNA genes do not have binding sites for 3707 miRNAs [1]. There were identified mRNA of ASXL1 and GNAS genes, which have fully complementary miRNA binding sites. In 5'UTR of mRNA of most genes, regions containing two or more miRNA binding sites with overlapped nucleotide sequences (clusters) were identified. mRNA of ASXL1 gene has a cluster of binding sites from 172 nt to 196 nt with a total length of 25 nt and with the value of the free interaction energy ΔG equal to -128 kJ/mole. mRNA of ARID1A gene has two clusters of binding sites in 5'UTR with an average ΔG value of -126 kJ/mole and -115 kJ/mole. mRNA of GNAS gene contains a cluster of binding sites from 30 nt to 69 nt with an average free interaction energy of -107 kJ/mole. mRNAs of SOAT1 and SOX9 genes have binding sites for single miRNAs.

In CDS mRNA of ARID1A gene, three clusters of miRNAs binding sites were found with an average ΔG value of -129, -128 and -127 kJ/mole, which is higher than the average free interaction energy of all sites in CDS. The presence of such clusters of binding sites indicates a strong dependence of the expression of this gene on each of these miRNAs. The formation of a cluster of binding sites for ARID1A gene leads to competition for the binding site. Four miRNAs have binding sites in mRNA of MUC5AC gene. All binding sites have the same $\Delta G/\Delta G_m$ value of 90% and a relatively equal ΔG value. TJU_CMC_MD2.ID00967.5p-miR with a length of 22 nt has several binding sites in mRNA of MUC5AC gene with $\Delta G = -115$ kJ/mole. mRNA of MUC6 gene has 5 binding sites in CDS. A higher ΔG value is observed in association with TJU_CMC_MD2.ID02888.5p-miR ($\Delta G = -121$ kJ/mole).

In 3'UTR mRNA of MLL2 gene, a cluster of binding sites from 17780 nt to 17820 nt was detected with a total length of 40 nt and an average free interaction energy of -118 kJ/mole. Multiple binding sites of TJU_CMC_MD2.ID00470.5p-miR were found in 3'UTR mRNA of CDKN2B and SMAD4 genes with an average ΔG value of -108 kJ/mole and $\Delta G/\Delta G_m = 89\%$.

The results of this study demonstrated that miRNA can regulate gene expression in 5'UTR, CDS and 3'UTR. The obtained results can serve as the basis for the development of new diagnostic markers and therapeutic targets for patients with small intestinal cancer.

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. E1106-E1115.

ХАРАКТЕРИСТИКИ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA В mRNA ГЕНОВ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

Пинский И.В.¹, Лабейт З.², Иващенко А.Т.¹

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан
050040, Алматы, пр. аль-Фараби, 71

e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

²Медицинский факультет Маннгейма университета Гейдельберга, Маннгейм, Германия
68167, Маннгейм, Theodor-Kutzer Ufer 1-3

Для 6334 miRNA найдены сайты связывания в mRNA генов актина, миозина, тропонина и тропомиозина человека и мыши. Установлено, что характеристики этих сайтов у мыши существенно отличаются от аналогичных характеристик у человека, поэтому мышь не может быть для них адекватной моделью.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, гены, актин, миозин, тропонин, тропомиозин

К сократительным белкам миокарда относятся актин, миозин, тропонин и тропомиозин. При патологических изменениях кардиомиоцитов в преддверии инфаркта миокарда происходит уменьшение синтеза этих белков. В этом процессе могут быть задействованы miRNA, которые регулируют экспрессию генов на уровне трансляции путём связывания с их mRNA и блокирования трансляции либо деградации mRNA. Поэтому было важно сравнить характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов сократительных белков миокарда человека и мыши, так как мышь является модельным объектом биомедицинских исследований. Программа MirTarget, разработанная в нашей лаборатории, определяет с высокой достоверностью ключевые количественные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA в 5'-UTR, CDS и 3'-UTR [1]. Было изучено связывание 6334 miRNA с mRNA генов актина ACTA2 и ACTC1, генов лёгких цепей миозина MYL2, MYL3 и MYL4, генов тяжёлых цепей миозина MYH6, MYH7 и MYH15, генов тропонина TNNT1, TNNT2 и гена тропомиозина TPM1 человека и мыши, экспрессирующихся в сердце. Мы выбрали 48 сайтов связывания miRNA в mRNA этих генов с учётом энергии связывания (ΔG , кДж/моль) и длины miRNA. В результате исследований было установлено, что десять miRNA имели сайты связывания в mRNA генов актина миокарда человека и мыши с величиной ΔG от -98 до -132 кДж/моль. miR-133b, miR-8-4989-5p, miR-4725-5p, miR-133a-3p, miR-19-40935-3p, miR-20-42659-3p и miR-367-3p связывались с mRNA гена ACTC1 человека. miR-19-44540-3p, miR-6834-3p и miR-19-43426-5p связывались с mRNA гена ACTA2 человека. С mRNA гена ACTC1 мыши связывалась miR-367-3p. Восемь miRNA связывались с mRNA генов миозина человека с величиной ΔG от -106 до -129 кДж/моль: miR-4763-3p с mRNA гена MYL4; miR-6894-3p, miR-6880-3p, miR-3158-5p, miR-6747-3p, miR-5-4100-5p и miR-15-36549-3p с mRNA гена MYH6; miR-3158-5p, miR-6747-3p и miR-5-4100-5p с mRNA гена MYH7; miR-19-23535-3p с mRNA гена MYH15. 12 miRNA связывались с mRNA генов миозина мыши с величиной ΔG от -98 до -121 кДж/моль: miR-19-38092-3p и miR-6780b-5p с mRNA гена MYL4; miR-22-40302-3p, miR-6747-3p, miR-6894-3p, miR-5006-3p, miR-15-36549-3p, miR-4326, miR-11-30469-3p, miR-6792-3p и miR-16-39952-5p с mRNA гена MYH6; miR-22-40302-3p, miR-6747-3p, miR-15-36549-3p, miR-4326 и miR-11-30469-3p с mRNA гена MYH7; miR-16-37541-3p связывалась с mRNA гена MYH15. Пять miRNA связывались с mRNA генов тропонина и тропомиозина человека с величиной ΔG от -113 до -123 кДж/моль: miR-6-16793-3p с mRNA гена TNNT2; miR-17-39011-3p с mRNA гена TNNT1; miR-15-35627-5p, miR-19-8151-3p и miR-1247-5p с mRNA гена тропомиозина человека TPM1. Четыре miRNA связывались с mRNA генов тропонина и тропомиозина мыши с величиной ΔG от -108 до -110 кДж/моль: miR-11-29785-3p, miR-11-29785-5p и miR-12-31214-5p с mRNA гена TNNT2 и miR-6784-3p с mRNA гена TPM1 мыши. Таким образом, несмотря на существенные отличия характеристик сайтов связывания miRNA в mRNA генов сократительных белков миокарда у человека и мыши, у этих видов было обнаружено несколько общих сайтов, которые могут иметь важное значение для диагностики инфаркта миокарда: miR-367-3p в mRNA гена ACTC1, miR-6894-3p и miR-6747-3p в mRNA гена MYH6 и miR-6747-3p в mRNA гена MYH7.

Литература:

1. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes// *Bioinformation*. 2014. Vol. 10. № 7. P. 423-427.

CHARACTERISTICS OF miRNA BINDING SITES IN mRNAs OF HUMAN AND MOUSE MYOCARDIAL CONTRACTILE PROTEIN GENES

Pinsky I.V.¹, Labeit S.², Ivashchenko A.T.¹

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

050040, Almaty, Al-Farabi Avenue, 71

e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

²Medical Faculty Mannheim of the University of Heidelberg, Mannheim, Germany

68167, Mannheim, Theodor-Kutzer Ufer 1-3

Binding sites for 6334 miRNAs were found in mRNAs of human and mouse genes of actin, myosin, troponin and tropomyosin. It was established that characteristics of human and mouse miRNA binding sites are significantly different so mouse can't be an adequate model for studying of human sites.

Key words: miRNAs, mRNAs, genes, actin, myosin, troponin, tropomyosin

Actin, myosin, troponin and tropomyosin are related to contractile proteins of myocardium. Decreasing of synthesis of these proteins is connected with pathological changes of cardiomyocytes during the myocardial infarction. miRNAs can be involved in this process because they regulate gene expression at the translational level, binding with mRNAs of genes and blocking translation or providing the degradation of mRNAs. So it was important to compare characteristics of miRNA binding sites in mRNAs of human and mouse myocardial contractile protein genes because mouse is a model object for biomedical investigations. The MirTarget program defines key quantitative characteristics of miRNA-mRNA interaction in 5'UTR, CDS and 3'UTR with high level of reliability [1]. Binding of 6334 miRNAs with mRNAs of ACTA2 and ACTC1 actin genes, MYL2, MYL3 и MYL4 genes of myosin light chains, MYH6, MYH7 и MYH15 genes of myosin heavy chains, TNNC1, TNNI3 and TNNT2 troponin genes and TPM1 gene of human and mouse troponin was studied. All of these genes are expressed in the heart. 48 miRNA binding sites in mRNAs of these genes were selected taking into account the energy of binding (ΔG , kJ/mole) and the length of miRNAs. As a result of study it was found that ten miRNAs had binding sites in mRNAs of human and mouse myocardial actin genes with value of ΔG varying from -98 to -132 kJ/mole. MiR-133b, miR-8-4989-5p, miR-4725-5p, miR-133a-3p, miR-19-40935-3p, miR-20-42659-3p and miR-367-3p bound with mRNA of human ACTC1 gene. MiR-19-44540-3p, miR-6834-3p and miR-19-43426-5p bound with mRNA of ACTA2 gene. MiR-367-3p bound with mRNA of mouse ACTC1 gene. Eight miRNAs bound with mRNAs of human myosin genes having value of ΔG varying from -106 to -129 kJ/mole: miR-4763-3p with mRNA of MYL4 gene; miR-6894-3p, miR-6880-3p, miR-3158-5p, miR-6747-3p, miR-5-4100-5p and miR-15-36549-3p with mRNA of MYH6 gene; miR-3158-5p, miR-6747-3p and miR-5-4100-5p with mRNA of MYH7 gene; miR-19-23535-3p with mRNA of MYH15 gene. Twelve miRNAs bound with mRNAs of mouse myosin genes with value of ΔG from -98 to -121 kJ/mole: miR-19-38092-3p and miR-6780b-5p with mRNA of MYL4 gene; miR-22-40302-3p, miR-6747-3p, miR-6894-3p, miR-5006-3p, miR-15-36549-3p, miR-4326, miR-11-30469-3p, miR-6792-3p and miR-16-39952-5p with mRNA of MYH6 gene; miR-22-40302-3p, miR-6747-3p, miR-15-36549-3p, miR-4326 and miR-11-30469-3p with mRNA of MYH7 gene; miR-16-37541-3p bound with mRNA of MYH15 gene. Five miRNAs bound with mRNAs of human troponin and tropomyosin genes with value of ΔG from -113 to -123 kJ/mole: miR-6-16793-3p with mRNA of TNNT2 gene; miR-17-39011-3p with mRNA of TNNI3 gene; miR-15-35627-5p, miR-19-8151-3p and miR-1247-5p with mRNA of TPM1 gene. Four miRNAs bound with mRNAs of mouse troponin and tropomyosin genes with value of ΔG from -108 to -110 kJ/mole: miR-11-29785-3p, miR-11-29785-5p and miR-12-31214-5p with mRNA of TNNT2, miR-6784-3p with mRNA of mouse TPM1 gene. Thus, human and mouse myocardial contractile protein genes have significantly different characteristics of miRNA binding sites in their mRNAs, but there are several common sites for both species that can be important for diagnostics of myocardial infarction: miR-367-3p in mRNA of ACTC1 gene, miR-6894-3p, miR-6747-3p in mRNA of MYH6 gene and miR-6747-3p in mRNA of MYH7 gene.

Литература:

1. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes// *Bioinformation*. 2014. Vol. 10. № 7. P. 423-427.

УДК: 577.214

GTRD – БАЗА ДАННЫХ ПО РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Евшин И.С.¹, Шарипов Р.Н.¹, Колмыков С.К.¹, Кондрахин Ю.В.^{1,2}, Колпаков Ф.А.^{1,2}

¹ООО «Биософт.Ру», Новосибирск, Россия

630090, г. Новосибирск, ул. Академика Ржанова, д. 6

²Институт вычислительных технологий СО РАН, Новосибирск, Россия

630090, г. Новосибирск, ул. Академика Ржанова, д. 6

e-mail: fkolpakov@gmail.com

GTRD - Gene Transcription Regulation Database (<http://gtrd.biouml.org>) - наиболее полная коллекция однородно обработанных данных ChIP-seq экспериментов для идентификации сайтов связывания транскрипционных факторов для 9 видов эукариот. Удобный веб-интерфейс, разработанный на основе платформы BioUML, обеспечивает удобный поиск информации и ее просмотр при помощи встроенного геномного браузера.

Ключевые слова: транскрипционные факторы, сайты связывания, ChIP-seq, DNase-seq, BioUML

Текущая версия базы данных GTRD - Gene Transcription Regulation Database регуляции транскрипции генов (GTRD; <http://gtrd.biouml.org>) содержит информацию о [1]:

1) сайтах связывания транскрипционных факторов (ССТФ) и коактиваторах транскрипции, идентифицированные с помощью экспериментов ChIP-seq для 9 видов эукариот: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Arabidopsis thaliana*;

2) районах открытого хроматина и ССТФ (DNase footprints), идентифицированных с помощью экспериментов DNase-seq;

3) районах, где ССТФ не могут быть идентифицированы из-за повторов;

4) потенциальные ССТФ для человека и мыши, идентифицированные с помощью весовых матриц из базы данных HOCOMOCO [2].

Исходные данные ChIP-seq и DNase-seq были получены из баз данных ENCODE и SRA и однотипно проанализированы. ССТФ (пики ChIP-seq) были определены с использованием четырех разных методов: MACS, SISSR, GEM и PICS. Далее ССТФ для одного и того же фактора и метода анализа, но для разных экспериментальных условий были объединены в кластеры.

Чтобы уменьшить шум, такие кластеры для 4 указанных выше методов анализа были объединены в мета-кластеры; таким образом, мы получили набор всех ССТФ (первое приближение цистрома) для каждого из 9 видов. В дополнение к информации о местоположении в геноме, каждый кластер содержит структурированную информацию о клеточных линиях и условиях эксперимента, извлеченную из описаний соответствующих экспериментов ChIP-seq. Так же мы разработали методы для расширенного контроля качества, которые были применены ко всем данным ChIP-seq экспериментов.

Веб-интерфейс для доступа к базе данных GTRD был разработан с использованием платформы BioUML (<http://biouml.org>). Он обеспечивает: просмотр и отображение информации; расширенные возможности поиска, например, поиск TFBS вблизи указанного гена или поиск всех генов, потенциально регулируемых указанным фактором транскрипции; встроенный геномный браузер, который обеспечивает визуализацию данных GTRD: считывание выравниваний, пиков, кластеров, мета-кластеров и информации о структурах генов из базы данных Ensembl и сайтов связывания, предсказанных с помощью весовых матриц из базы данных HOCOMOCO.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00296.

Литература:

1. Leirach H. Omics approaches to individual variation: modeling networks and the virtual patient // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2016. Vol. 8. № 3. P. 253-265.

2. Киселев И.Н., Семисалов Б.В., Бибердорф Э.А., Шарипов Р.Н., Блохин А.М., Колпаков Ф.А. Модульное моделирование сердечно-сосудистой системы человека // *Математическая биология и биоинформатика.* — 2012. — Т. 7. — № 2. С. 703–736.

UDC: 577.214

GTRD: A DATABASE ON GENE TRANSCRIPTION REGULATION

Yevshin I.S.¹ Sharipov R.N.¹, Kolmykov S.K.¹, Kondrakhin Yu.V.^{1,2}, Kolpakov F.A.^{1,2}

¹ Biosoft.Ru, LLC, Novosibirsk, Russia

630090, Novosibirsk, Akademika Rzhanova 6

² Institute of computational technologies SB RAS, Novosibirsk, Russia

630090, Novosibirsk, Akademika Rzhanova 6

e-mail: fkolpakov@gmail.com

GTRD - Gene Transcription Regulation Database (<http://gtrd.biouml.org>) - is the most complete collection of uniformly processed ChIP-seq data to identify transcription factor binding sites for 9 species. Convenient web interface with advanced search, browsing and genome browser based on the BioUML platform.

Key words: transcription factors, binding sites, ChIP-seq, DNase-seq, BioUML

The current version of the Gene Transcription Regulation Database (GTRD; <http://gtrd.biouml.org>) contains information about [1]:

1) transcription factor binding sites (TFBSs) and transcription coactivators identified by ChIP-seq experiments for 9 species: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Arabidopsis thaliana*;

2) regions of open chromatin and TFBSs (DNase footprints) identified by DNase-seq;

3) unmappable regions where TFBSs cannot be identified due to repeats;

4) potential TFBSs for both human and mouse using position weight matrices from the HOCOMOCO database [2].

Raw ChIP-seq and DNase-seq data were obtained from ENCODE and SRA, and uniformly processed. ChIP-seq peaks were called using four different methods: MACS, SISSRs, GEM and PICS. Moreover, peaks for the same factor and peak calling method,

albeit using different experiment conditions (cell line, treatment, etc.), were merged into clusters. To reduce noise, such clusters for different peak calling methods were merged into meta-clusters; these were considered to be non-redundant TFBS sets (first approximation of cistrome). In addition to information on location in genome, the sets contain structured information about cell lines and experimental conditions extracted from descriptions of corresponding ChIP-seq experiments. Extended quality control was applied to all ChIP-seq data.

A web interface to access GTRD was developed using the BioUML platform (<http://biouml.org>). It provides: browsing and displaying information; advanced search possibilities, e.g. search of TFBSs near the specified gene or search of all genes potentially regulated by a specified transcription factor; integrated genome browser that provides visualization of the GTRD data: read alignments, peaks, clusters, metaclusters and information about gene structures from the Ensembl database and binding sites predicted using position weight matrices from the HOCOMOCO database.

Work is supported by the grant of the RFBR 17-00-00296.

References:

1. Yevshin I., Sharipov R., Kolmykov S., Kondrakhin Y., Kolpakov F. GTRD: a database on gene transcription regulation-2019 update // *Nucleic acids research*. 2018. Vol. 47(D1). P. D100-D105.

2. Kulakovskiy I.V., Vorontsov I.E., Yevshin I.S., Sharipov R.N., Fedorova A.D., Rumynskiy E.I., Medvedeva Y.A., Magana-Mora A., Bajic V.B., Papatsenko D.A., Kolpakov F.A., Makeev V.J. HOCOMOCO: towards a complete collection of transcription factor binding models for human and mouse via large-scale ChIP-Seq analysis // *Nucleic acids research*. 2017. Vol. 46(D1). P. D252-D259.

БИОЭКОНОМИКА

BIOECONOMICS

БИОАНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ В СОВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

BIOANALYTIC CHEMISTRY IN MODERN DIAGNOSTICS AND BIOTECHNOLOGY

1. АПТОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРОМБИНА ЧЕЛОВЕКА, А.М.Соловьев	395
ENZYME APTAMER-BASED ASSAY FOR THE DETERMINATION OF HUMAN THROMBIN, A.Solovjev	396
2. БЕЗМЕМБРАННЫЙ ИНТЕГРИРОВАННЫЙ В МИКРОФЛЮИДНЫЙ ЧИП ДАТЧИК ПОТОКА С ТЕМПЕРАТУРНОЙ КОМПЕНСАЦИЕЙ, В.В.Рыжков, А.В.Зверев, М.М.Андроник, А.И.Иванов, А.С.Бабури, Д.О.Москалёв, В.В.Ечеистов, И.А.Родионов	396
MEMBRANELESS ON-CHIP MICROFLUIDIC LIQUID FLOW SENSOR WITH THERMAL COMPENSATION, V.Ryzhkov, A.Zverev, M.Andronik, A.Ivanov, A.Baburin, D.Moskalev, V.Echeistov, I.Rodionov	397
3. ГИБКИЕ УГЛЕРОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ КАК ОСНОВА МИКРОБНЫХ БТЭ И БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ, Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Решетилов А.Н.	398
FLEXIBLE CARBON MATERIALS AS A BASIS FOR MICROBIAL FUEL CELLS AND BIOSENSORS FOR THE MONITORING OF FERMENTATION PROCESSES, Tarasov S.E., Plekhanova Yu.V., Reshetilov A.N.	399
4. ГИБРИДИЗАЦИЯ IN-SITU. БЫСТРОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ И ТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ, Соловьева М.Н., Гудов В.П., Ткачук А.П., Гушин В.А.	400
IN-SITU HYBRIDIZATION. RAPID QUANTITATIVE DETECTION AND TYPING OF BACTERIAL PATHOGENS, Solovyova M.N., Gudov V.P., Tkachuk A.P., Gushchin V.A.	403
5. ГИБРИДНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ КАК МЕТОД ГРУППОВОГО РАСПОЗНАВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНАЛИТОВ И ИХ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ, Буркин М.А., Нуриев Р.И., Гальвидис И.А.	405
HYBRID IMMUNOASSAY AS A GROUP RECOGNITION METHOD FOR LOW MOLECULAR WEIGHT ANALYTES AND THEIR STRUCTURAL ANALOGUES, Burkin M.A., Nuriev R.I., Galvidis I.A.	406
6. ГОМОГЕННЫЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ III С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЕРОКСИДАЗА-ПОДОБНОГО ДНКЗИМА, К.М.Буркин, О.Л.Бодулев, И.Ю.Сахаров	406
HOMOGENEOUS CHEMILUMINESCENT METHOD FOR THE DETERMINATION OF EXONUCLEASE III USING PEROXIDASE-MIMICKING DNAZYME, K.Burkin, O.Bodulev, I.Sakharov	407
7. ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТРОПОНИНА Т, Сафенкова И.В., Иванов А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. ...	408
ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA AS A WAY TO INCREASE THE SENSITIVITY OF IMMUNOASSAY FOR TROPONIN T DETECTION, Safenkova I.V., Ivanov A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.	409
8. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕСТРУКТУРНЫХ АНТИГЕНОВ, Муканов К.К., Ескендинова С.З., Раманкулов Е.М., Мукантаев К.Н.	410
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR DETECTION OF FMDV BY RECOMBINANT NON-STRUCTURAL ANTIGENS, Mukanov K.K., Eskendirova S.Z., Ramankulov E.M., Mukantaev K.N.	411
9. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ НАНОДИСПЕРСНЫХ МАРКЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ: ПУТИ СНИЖЕНИЯ ПРЕДЕЛА ДЕТЕКЦИИ, Дзантиев Б.Б.	412
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SYSTEMS WITH DIFFERENT NANOLABELS AND THEIR COMPLEXES: WAYS TO REDUCE THE DETECTION LIMIT, Dzantiev B.B.	413

10. МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ЯМР-АНАЛИЗА: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ, Храмцов П.В., Баркина И.А., Кропанева М.Д., Бызов И.В., Минин А.С., Мысик А.А., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Уймин М.А., Заморина С.А., Ермаков А.Е., Раев М.Б.	413
MAGNETIC NANOPARTICLES FOR NMR-BASED ASSAY: PREPARATION, PROPERTIES AND APPLICATION, Khramtsov P.V., Barkina I.A., Kropaneva M.D., Byzov I.V., Minin A.S., Mysik A.A., Bochkova M.S., Timganova V.P., Uimin M.A., Zamorina S.A., Yermakov A.E., Rayev M.B.	414
11. МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА АНТИБИОТИКА КОЛИСТИНА, Серченя Т.С., Дубовская Л.В., Свиридов О.В.	415
MODEL LATERAL FLOW IMMUNOASSAY SYSTEMS FOR ANTIBIOTIC COLISTIN, Serchenya T.S., Dubovskaya L.V., Sviridov O.V.	416
12. НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И АМФИФИЛЬНЫХ ДИБЛОКСОПОЛИМЕРОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОСЕНСОРНЫХ ПОКРЫТИЙ, А.Ю.Коняхина.	417
NANOCOMPOSITES BASED ON CARBON NANOTUBES AND AMPHIPHILIC DIBLOCK COPOLYMERS: PREPARATION AND PROSPECTS OF APPLICATION AS BIOSENSOR COATINGS, A. Konyakhina	417
13. НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДА: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ МЕТОК, Горячева И.Ю., Кокорина А.А., Цюпка Д.В., Мордовина Е.А.	418
NANOSIZED LUMINESCENT CARBON-BASED MATERIALS: SOME PERSPECTIVES TO USE AS LABELS, Goryacheva I.Y., Kokorina A.A., Tsyupka D.V., Mordovina E.A.	418
14. ОБНАРУЖЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕДЛЕННОЙ ИЗОФОРМЫ СКЕЛЕТНОГО ТРОПОНИНА I В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА, Богомолова А.П., Березникова А.В.	419
DETECTION OF SKELETAL MUSCLE INJURY USING THE SLOW ISOFORM OF SKELETAL TROPONIN I AS A MARKER, Bogomolova A.P., Bereznikova A.V.	420
15. ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА С ИОНАМИ ЕВРОПИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ПРЯМОМ ЛАНТАНИДНОМ ИММУНОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ, Д.А.Семёнов.	421
OBTAINING A COMPLEX OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN WITH EUROPIUM IONS AND ITS APPLICATION IN DIRECT LANTHANIDE IMMUNOFLUORESCENCE ANALYSIS, D.Semenov	422
16. ПРИМЕНЕНИЕ НАНОПРОВОЛОЧНОГО ДЕТЕКТОРА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКА CA 125, Мальсагова К.А., Плешакова Т.О., Иванов Ю.Д., Попов В.П., Арчаков А.И.	423
THE USE OF A NANOWIRE DETECTOR FOR THE REVELATION OF CA 125 PROTEIN, Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Ivanov Yu.D., Popov V.P., Archakov A.I.	424
17. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ КОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛИКОПРОТЕИНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БЕРЕМЕННОСТЬЮ (PAGS), В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ, Рябкова Н. С.	425
DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINATION PREGNANCY IN COWS USING PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEINS (PAGS) AS MARKERS, Riabkova N. S.	426
18. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИФА С ПРИМЕНЕНИЕМ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И С ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ, Еремин С.А., Пантелеева А.В., Шанин И.А., Кострикина Е.С., Лебедин Ю.С.	427
DEVELOPMENT OF ELISA WITH THE APPLICATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND CHEMILUMINESCENT DETECTION, Eremin S.A., Panteleeva A.V., Shanin I.A., Kostrikina E.S., Lebedin Yu.S.	427
19. РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ДАВЛЕНИЯ ДЛЯ УСТРОЙСТВ ТИПА «ЛАБОРАТОРИЯ-НА-ЧИПЕ», Ечеистов В.В., Зверев А.В., Родионов И.А., Макачук В.В., Рыжков В.В.	428
DEVELOPMENT OF UNIVERSAL PRESSURE CONTROL SYSTEM FOR LAB-ON-CHIP DEVICES, Echeistov V.V., Zverev A.V., Rodionov I.A., Makarchuk V.V., Ryzhkov V.V.	429
20. ТВЕРДОФАЗНЫЙ ЯМР-АНАЛИЗ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРОСТАТСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА, Кропанева М.Д., Храмцов П.В., Бызов И.В., Минин А.С., Мысик А.А., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Уймин М.А., Заморина С.А., Ермаков А.Е., Раев М.Б.	429
SOLID-PHASE NMR-BASED ASSAY FOR PROSTATSPECIFIC ANTIGEN DETECTION, Kropaneva M.D., Khramtsov P.V., Byzov I.V., Minin A.S., Mysik A.A., Bochkova M.S., Timganova V.P., Uimin M.A., Zamorina S.A., Yermakov A.E., Rayev M.B.	431
21. ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ОБНАРУЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ, Яминский И.В.	432
PHYSICAL PRINCIPLES OF BIOLOGICAL AGENTS DETECTION USING ELECTROMECHANICAL BIOSENSORS, Yaminsky I.V.	433

22. ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ ДНК КАК ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, Шумянцева В.В., Булко Т.В., Пергушов Д.В., Сиголаева Л.В.....	434
ELECTROANALYSIS OF DNA AS A PHARMACOLOGICAL TARGET OF DRUGS ACTIONS, Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Pergushov D.V., Sigolaeva L.V.....	434
23. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ, Евтюгин Г.А., Порфирьева А.В., Стойков И.И.	435
ELECTROCHEMICAL DNA SENSORS BASED ON SUPRAMOLECULAR INTERACTIONS WITH MACROCYCLIC LIGANDS, Evtugyn G.A., Porfiryeva A.V., Stoikov I.I.	435
24. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ IN VITRO НА ПРИМЕРЕ АМИЛОИДА-БЕТА – ПЕПТИДА, ВОВЛЕЧЁННОГО В ПАТОГЕНЕЗ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА, Супрун Е.В., Радько С.П., Хмелёва С.А., Козин С.А., Митькевич В.А., Макаров А.А.2.....	436
ELECTROCHEMICAL ANALYSIS IN STUDING PROTEIN AND PEPTIDE AGGEGATION MECHANISMS IN VITRO: THE CASE OF AMYLOID-BETA IMPLEMENTED IN THE ALZHEIMER'S DISEASE PATHOGENESIS, Suprun E.V., Radko S.P., Khmeleva S.A., Kozin S.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A.	437
25. ЭТАПЫ УЛУЧШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРУППОВОГО ИММУНОАНАЛИЗА СУЛЬФОНИЛАМИДОВ, Буркин К.М., Гальвидис И.А., Лапа Г.Б., Зубков А.В., Еремин С.А., Буркин М.А.	438
STEPS TAKEN TO IMPROVE THE SENSITIVITY OF GROUP-SPECIFIC IMMUNOASSAY OF SULFONAMIDES, Burkin K.M., Galvidis I.A., Lapa G.B., Zubkov A.V., Eremin S.A., Burkin M.A.	439

АПТОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРОМБИНА ЧЕЛОВЕКА

А.М.Соловьев

МГУ имени М. В. Ломоносова, Химический факультет, Россия, 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1с3
e-mail: asol0850@gmail.com

Разработан гетерогенный метод определения тромбина человека – одного из ключевых ферментов системы свертывания крови. Оптимизированные условия проведения анализа позволили определять до 1.3 нМ.

Ключевые слова: аптамеры, тромбин, амплификация

Тромбин – сериновая протеаза, которая играет важную роль в свертывании крови, расщепляя фибриноген с образованием фибрина. В данной работе разработан аптоферментный метод анализа тромбина. Так как тромбин имеет 2 сайта специфического связывания с его аптамерами, в первую очередь был разработан сендвич метод. Данный гетерогенный метод основывался на применении биотинилированного аптамера TBA 15 (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'), который взаимодействует с фибриноген-связывающим сайтом ($K_d \sim 100$ нМ), и флуоресцеин-модифицированного (ФМ) аптамера TBA 29 (5'-TAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA-3'), который взаимодействует с гепарин-связывающим сайтом ($K_d \sim 0.5$ нМ). Иммунизация ФМ-TBA 29 осуществлялась за счет его взаимодействия с антителами против флуоресцина, предварительно сорбированных в лунках планшета. Для детекции образовавшегося комплекса последовательно использовались биотинилированный TBA 15 и конъюгат стрептавидина с полипероксидазой. Полипероксидаза использовалась как амплифицирующий агент для повышения регистрирующего сигнала. Для регистрации ферментативной активности пероксидазы использовалась субстратная смесь на основе АБТС и пероксида водорода. Условия для аптоферментного определения тромбина были оптимизированы при варьировании концентрации NaCl в буферном растворе, температуры и времени анализа и концентрации ФМ-TBA 29 и биотин-TBA 15. В оптимизированных условиях предел детекции и линейный диапазон обнаружения тромбина составили 1.3 нМ и 2 - 9 нМ соответственно. Сравнение аналитических параметров разработанного метода с конкурентным методом определения тромбина продемонстрировало преимущества сендвич анализа.

Разработан чувствительный аптоферментный метод определения тромбина человека, предел обнаружения и линейный диапазон которого составили 1.3 нМ и 2 - 9 нМ соответственно.

Данная работа была поддержана Российским Научным Фондом (17-14-01042).

ENZYME APTAMER-BASED ASSAY FOR THE DETERMINATION OF HUMAN THROMBIN

A.Solovjev

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Russia, 119234, Moscow, Leninskie Gory, 1c3
e-mail: asol0850@gmail.com

A heterogeneous enzyme aptamer-based assay for the determination of human thrombin, one of the key enzymes in the blood coagulation system, was developed. Optimized assay conditions allowed a determination of thrombin with detection limit of 1.3 nM.

Key words: aptamers, thrombin, amplification

Thrombin is a serine protease that plays an important role in blood coagulation by cleaving fibrinogen to form fibrin. In this work, an enzyme aptmer-based assay for the determination of thrombin was developed. Since thrombin has 2 binding sites to its specific aptamers, the sandwich method was first developed. This heterogeneous method was based on the use of the biotinylated TBA 15 aptamer (5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3'), which interacts with the fibrinogen-binding site ($K_d \sim 100$ nM), and the fluorescein-modified TBA 29 aptamer (5'-TAGTCCGTGGTAGGGCA GGTGGGGTGACT-3'), which interacts with the heparin-binding site ($K_d \sim 0.5$ nM). The immobilization of FAM-TBA 29 was carried out due to its interaction with anti-fluorescein antibodies, pre-sorbed in the wells of the microtiter plates. For detection of the formed complex, biotinylated TBA 15 and conjugate streptavidin and poly peroxidase were sequentially used. Poly peroxidase conjugate was used as an amplifying agent to enhance the detecting signal. To measure the enzyme activity of peroxidase, a substrate mixture based on ABTS and hydrogen peroxide was used. Experimental conditions for the enzyme aptamer-based assay of thrombin were optimized by varying the concentration of NaCl in the buffer solution, the temperature and time of analysis, and the concentration of FAM-TBA 29 and biotin-TBA 15. Under optimized conditions, the detection limit and the linear range of thrombin were 1.3 nM and 2 - 9 nM, respectively. A comparison of the analytical parameters of the developed method with those of the competitive method for the detection of thrombin clearly demonstrated the advantages of the sandwich assay.

A sensitive method for determining human thrombin has been developed. The detection limit and linear detection range were 1.3 nM and 2 - 9 nM, respectively.

This work was supported by the Russian Science Foundation (17-14-01042).

УДК: 53.082.64, ББК: 35.114

БЕЗМЕМБРАННЫЙ ИНТЕГРИРОВАННЫЙ В МИКРОФЛЮИДНЫЙ ЧИП ДАТЧИК ПОТОКА С ТЕМПЕРАТУРНОЙ КОМПЕНСАЦИЕЙ

В.В.Рыжков, А.В.Зверев, М.М.Андроник, А.И.Иванов, А.С.Бабури, Д.О.Москалёв, В.В.Ечеистов, И.А.Родионов

МГТУ им. Н.Э. Баумана, Россия, 105005, Москва, 2-я Бауманская, д. 5, стр. 1
e-mail: vv.rizhkov@gmail.com

Разработан безмембранный тепловой микрофлюидный датчик потока жидкости, интегрируемый в микрофлюидный чип. Представленный датчик оснащён системой температурной компенсации и позволяет в реальном времени измерять поток в канале микрофлюидного чипа и может быть использован для экспериментальной верификации расчётных моделей микрофлюидных чипов, а также быстрого прототипирования и контроля потока в каналах микрофлюидных систем.

Ключевые слова: Микрофлюидика, сенсор, лаборатория-на-чипе, безмембранный, датчик потока, быстрое прототипирование

С развитием понимания механизмов различных биохимических процессов растёт количество манипуляций с реагентами, проводимых на микрофлюидном чипе и сложность проектирования новых комплексных систем, проводящих многостадийные химические процессы на одном чипе, называемых лабораториями-на-чипе. Когда методы теоретического расчёта и оптимизации топологии микрофлюидного

чипа становятся недостаточно эффективными, представляется актуальной задача измерения потоков жидкости в каналах микрофлюидного чипа для быстрого прототипирования и разработки нового микрофлюидного устройства. Микрофлюидные тепловые датчики потока (МТДП) являются наиболее технологичным решением данной задачи, поскольку не имеют в конструкции движущихся частей, могут быть изготовлены по технологиям микроэлектроники и занимают меньшую площадь на чипе, по сравнению с другими типами датчиков потока. В данной работе изготовлено и испытано более 80 различных МТДП, в результате серии экспериментов решена задача оптимизации параметров чувствительных элементов и измерительной схемы. Удалось добиться высоких характеристик датчика: чувствительность 23,28 мВ/(мкл/мин) в диапазоне 0-59 мкл/мин и стабильность работы после 100-часового стресс-теста, в ходе которого поток в микроканале датчика периодически изменяли в диапазоне 0-1000 мкл/мин. Датчик интегрирован в микрофлюидный чип из биосовместимого полимера полидиметилсилоксана (ПДМС) и оснащён системой температурной компенсации. Тонкоплёночные чувствительные элементы сформированы методом газовой фазной осаждения (PVD) никеля на подложке из боросиликатного стекла по 2 мкм-технологии взрывной литографии и после термостабилизации защищены PVD-плёнкой SiO₂. Главным преимуществом разработанного датчика является отсутствие мембраны в конструкции, благодаря чему удалось значительно снизить стоимость и сложность изготовления датчика. Кроме того, благодаря переходу от кремния к стеклу в качестве материала подложки, стало возможным создание оптически прозрачных микрофлюидных чипов с интегрированными датчиками потока.

Таким образом, разработанный датчик позволяет измерять поток жидкости в каналах микрофлюидного чипа в реальном времени и может быть использован для экспериментальной верификации расчётных моделей микрофлюидных чипов, быстрого прототипирования и контроля потока в каналах микрофлюидных биоаналитических систем.

Исследования выполнены с использованием материально-технической базы ЦКП Научно-образовательного центра «Функциональные Микро/Наносистемы» МГТУ им. Н.Э. Баумана (ID 74300).

UDC: 53.082.64

MEMBRANELESS ON-CHIP MICROFLUIDIC LIQUID FLOW SENSOR WITH THERMAL COMPENSATION

V.Ryzhkov, A.Zverev, M.Andronik, A.Ivanov, A.Baburin, D.Moskalev, V.Echeistov, I.Rodionov

Bauman Moscow State Technical University, Russia, 105005, Moscow, 2 nd Baumanskaya Str., 5, bld. 1
e-mail: vv.rizhkov@gmail.com

A novel membraneless on-chip microfluidic liquid flow sensor based on modified constant temperature anemometer principle with temperature compensation is proposed. The developed sensor allows real-time measurement of the flow rate in the channel of a microfluidic chip and can be used for experimental verification of computational models of a microfluidic chip, as well as for rapid prototyping and flow control in microfluidic system channels.

Key words: Microfluidics, lab on a chip, membraneless, flow sensor, fast prototyping

Deepening the understanding of various biochemical processes results in increase number of manipulations with reagents on a microfluidic chip that leads to complication in designing new laboratories on a chip. The development of a robust fluid flow measurement system on a chip will significantly simplify the process of optimizing microfluidic chip topology and speed up the development of a new microfluidic device. Microfluidic heat flow sensors (MHFS) are the most technologically advanced solution of this problem, because they have no moving parts in design, can be manufactured using microelectronics technology and occupy a smaller area on the chip compared to other types of flow sensors. In this article, more than 80 different MHFSs have been manufactured and tested. Based on acquired experimental data, the problem of optimizing sensitive elements parameters and components of the measurement circuit has been solved. High sensor performance has been achieved: sensitivity of 23.28 mV/(μ L/min) in the range of 0–59 μ L/min and stability after 100-hours stress test. During the test the flow in the sensor microchannel periodically varied in the range of 0–1000 μ L/min. Proposed membraneless on-chip microfluidic liquid flow sensor based on modified constant temperature anemometer principle with temperature compensation is built into the biocompatible PDMS microfluidic chip. Thin film nickel sensing elements are physically vapour deposited on a borosilicate glass substrate and covered with silicon oxide. The membraneless design is the key feature of our approach that opens new horizons in frontier lab-on-chip applications due to crucial

simplification of technology, cost-cutting and CMOS process compatibility. In addition, due to the transition from silicon to a glass as a substrate material, it has become possible to create optically transparent microfluidic chips with integrated flow sensors.

Thus, the developed sensor allows real-time measurements of the flow in the channels of a microfluidic chip and can be used for experimental verification of computational models of a microfluidic chip, rapid prototyping and flow control in the channels of microfluidic bioanalytical systems.

The studies were conducted using the material and technical base of the Collective Scientific Center of the Research and Educational Center "Functional Micro / Nanosystems" of the Bauman Moscow State Technical University (ID 74300).

УДК 543.55:543.95

ГИБКИЕ УГЛЕРОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ КАК ОСНОВА МИКРОБНЫХ БТЭ И БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ

Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Решетилов А.Н.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Пущино, Россия
142290, Пущино, пр. Науки, д. 5
e-mail: setar25@gmail.com

Получены гибкие биоэлектроды из углеродных волокнистых материалов, которые могут быть использованы в составе микробных БТЭ и ферментных биосенсоров, в частности для непрерывного контроля ферментационных процессов.

Ключевые слова: гибкие электроды, углеродные материалы, биосенсоры, биотопливные элементы

Развитие биосенсоров связано с поиском и исследованием свойств новых материалов для создания электродов, обладающих высокой удельной поверхностью, высокой электропроводностью, биосовместимостью. Значительное внимание уделяется углеродным волокнам на основе полиакрилонитрила (ПАН), обладающим высокодисперсной структурой (УВМ). Углеродные волокна из ПАН с высокой удельной площадью получают методом электроформования, который позволяет варьировать свойства продукта в зависимости от условий процесса.

Целью работы было изучение возможности использования гибких углеродных материалов из ПАН в качестве биоэлектродов для БТЭ и биосенсоров, которые можно было бы применить для контроля различных ферментационных процессов.

В качестве прекурсора использовали УВМ (ООО «Ниагара», г. Москва) из микроскопических волокон диаметром 15.2 мкм. Электроформование УВМ выполняли в лаборатории полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт» (Москва). Было изучено 6 различных модификаций УВМ, отличающихся между собой условиями электроформования и температурой карбонизации. При этом электропроводностью обладали лишь те модификации, в химическом составе которых не содержалось азота.

Электрохимические свойства биоэлектродов из УВМ были проверены с помощью методов электрохимической импедансной спектроскопии и циклической вольтамперометрии. Измерения проводили по трехэлектродной схеме измерения при потенциале в 200 мВ, при этом электроды из УВМ исполняли роль рабочих, платиновый электрод был вспомогательным, а в качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод.

Наименьшим сопротивлением переноса заряда обладали биоэлектроды, основанные на УВМ, содержащем 97.5 % углерода и 2.5 % кислорода. Данный материал получался при карбонизации в течение часа при температуре 1000 °С, диаметр волокон материала составлял 430 нм. Следует отметить, что низкое сопротивление переноса заряда для этого материала сохранялось для всех исследованных биологических объектов, иммобилизованных на поверхности электрода – бактерий *Gluconobacter oxydans*, их мембранных фракций, а также отдельных ферментов (глюкозооксидаза и алкогольоксидаза). Было проведено сравнение параметров микробных БТЭ, основанных на электродах из УВМ и на традиционных электродах из спектрального графита. Сравнение мощностных характеристик БТЭ представлено на рисунке. Показано, что БТЭ на основе биоанода из УВМ позволяет добиться увеличения удельной мощности на 25 % по сравнению с аналогом из традиционных материалов.

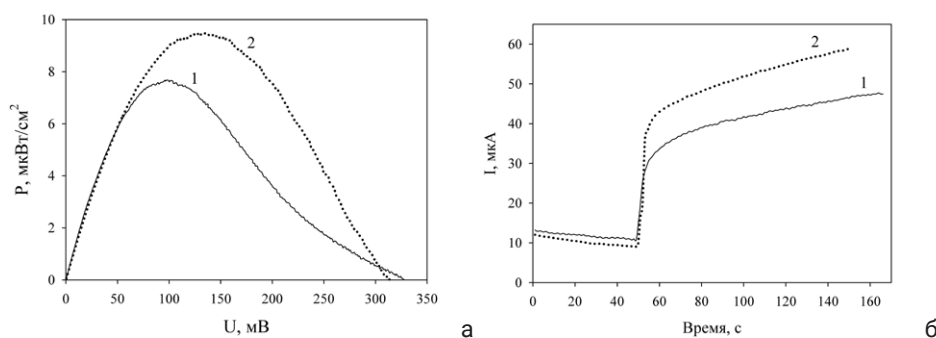


Рис.1. Мощностные характеристики (а) и виды сигналов на введение субстрата (б) БТЭ на основе био-электродов из спектрального графита (1) и УВМ (2)

Таким образом, предложен вариант гибких углеродных материалов, которые можно использовать в качестве биоэлектродов для иммобилизации на них целых клеток бактерий, мембранных фракций или ферментов. Данные электроды могут быть применены на спиртовых производствах, где микробные БТЭ на основе УВМ будут обеспечивать энергией ферментные биосенсоры для мониторинга концентраций глюкозы и этанола на разных этапах технологического процесса. Кроме того, гибкие биоэлектроды могут быть использованы в медицине и биоэлектронике, в частности, при создании носимых биосенсоров.

UDC 543.55:543.95

FLEXIBLE CARBON MATERIALS AS A BASIS FOR MICROBIAL FUEL CELLS AND BIOSENSORS FOR THE MONITORING OF FERMENTATION PROCESSES

Tarasov S.E., Plekhanova Yu.V., Reshetilov A.N.

G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

142290, Moscow region, Pushchino, prospekt Nauki, 5

e-mail: setar25@gmail.com

Flexible bioelectrodes from carbon fibrous materials were obtained, which could be used in microbial fuel cells and enzyme biosensors for monitoring of fermentation processes.

Key words: flexible electrodes, carbon materials, biosensors, biofuel cells

The development of biosensors is associated with the search and study of the properties of new materials for the creation of electrodes with large surface area, high electrical conductivity, and biocompatibility. Considerable attention is paid to carbon fibers based on polyacrylonitrile (PAN), with a highly dispersed structure (CSM). PAN carbon fibers with a large surface area are obtained by electroforming, which allows you to vary the properties of the product depending on the process conditions.

The aim of this study was to research the possibility of using flexible carbon materials produced from PAN as bioelectrodes for MFCs and biosensors, which could be used to monitor various fermentation processes. CSM (OOO Niagara, Moscow) made of microscopic fibers with a diameter of 15.2 microns was used as a precursor. Electroforming of CSMs was carried out in the laboratory of polymeric materials of the Kurchatov Institute Research Center (Moscow). We studied 6 different modifications of CSMs, which we produced under different electrospinning conditions and carbonization temperature. In this case, only those modifications that did not contain nitrogen in the chemical composition were conductive.

Electrochemical properties of bioelectrodes from CSM were evaluated using the electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. The measurements were carried out using a three-electrode measurement scheme with an applied potential of 200 mV. Electrodes made of CSMs were used as working electrodes, the platinum electrode was an auxiliary electrode, and the silver chloride electrode was used as a reference electrode.

Bioelectrodes based on CSM consisting of 97.5% carbon and 2.5% oxygen had the lowest charge transfer resistance out of all modifications. This material was obtained by carbonization for one hour at a temperature of

1000 °C, and the diameter of the fibers of the material was 430 nm. It should be noted that the low charge transfer resistance for this material was preserved for all the studied biological objects immobilized on the electrode surface — *Gluconobacter oxydans* cells, their membrane fractions, and also individual enzymes (glucose oxidase and alcohol oxidase). A comparison was made of the parameters of microbial MFC based on CSM electrodes and on traditional electrodes from spectral graphite. Comparison of power characteristics of BFC is presented in the figure. It is shown that the MFC based on a CSM bioanode makes it possible to achieve an increase in the power output of the MFC by 25% in comparison with an analogue from traditional materials.

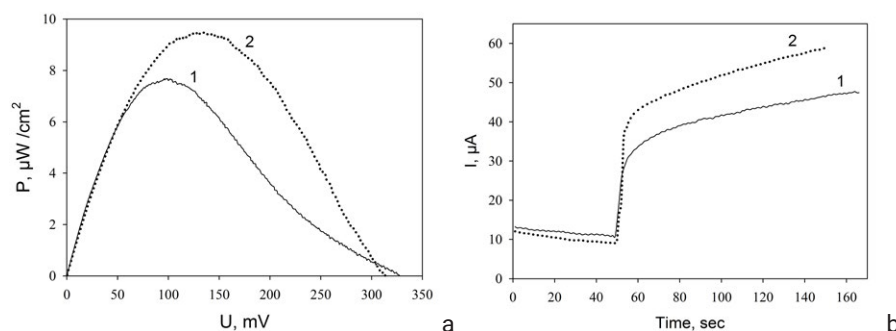


Fig. 1. Power characteristics (a) and types of electrode response after the introduction of the substrate (b) of MFC based on bioelectrodes from spectral graphite (1) and CSM (2)

A variant of flexible carbon materials that can be used as bioelectrodes to immobilize whole bacterial cells, membrane fractions or enzymes on them is proposed. These electrodes could be used in alcohol production, where microbial MFCs based on CSM will provide energy to enzyme biosensors for monitoring of glucose and ethanol concentrations at different stages of the process. In addition, flexible bioelectrodes could be used in medicine and bioelectronics, in particular, when creating wearable biosensors.

УДК 543.95, 57.083.18

ГИБРИДИЗАЦИЯ *IN-SITU*. БЫСТРОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ И ТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ

Соловьева М.Н., Гудов В.П., Ткачук А.П., Гушин 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

Была проделана экспериментальная работа по гибридизации флуоресцентно-меченых LNA зондов с рРНК клеток бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, исследована специфичность связывания используемых зондов. Детекция флуоресценции проводилась посредством метода флуоресцентной микроскопии, при этом показано отсутствие ложноположительных сигналов.

Ключевые слова: флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), закрытые нуклеиновые кислоты (LNA), бактериальные патогены

Часто в клинической практике необходимо решать вопросы, связанные с быстрым и точным определением бактериальной нагрузки на организм человека, где важно знать вид микроорганизма и его количество. Данный анализ необходим как при терапевтическом обследовании, так и при подготовке пациента к хирургическому вмешательству, например, для предотвращения септического шока, в 25-50 % случаев приводящего к летальному исходу [1].

Микробиологический посев крови и ПЦР/ПЦР-РВ являются наиболее часто используемыми методами для определения патогенов, однако это трудоемкие и времязатратные процессы, которые нередко приводят к ложноотрицательным результатам. В связи с этим необходимо развивать подходы, которые не

нуждаются в культивировании микроорганизмов, или же в выделении ДНК для репликации *in vitro* [2]. Для решения описанных проблем перспективным является применение метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), который позволяет обнаруживать бактериальные патогены путем связывания флуоресцентно-меченых LNA зондов с рибосомальной РНК (рРНК) искоемых агентов [3-6].

Цели данной работы заключались в отработке FISH протокола и изучении специфичности связывания флуоресцентно-меченых LNA зондов с комплементарными к ним фрагментами 16S, 23S РНК бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhimurium*. Для этого был выполнен ряд экспериментов по гибридизации LNA зондов с рРНК соответствующих бактериальных штаммов в условиях присутствия зондов либо к одному виду прокариотов, либо к двум видам одновременно. Флуоресцентные метки, иммобилизованные на 5'- или на 3'-конец зондов, были подобраны так, чтобы их максимумы поглощения и испускания света не перекрывали друг друга (табл. 1).

Таблица 1. Характеристики флуорофоров, используемых в LNA зондах.

Клетки бактерий	Флуорофор	Максимум поглощения, нм	Максимум испускания, нм
<i>E. coli</i>	FAM	495	520
<i>S. typhimurium</i>	ROX	580	605
<i>P. aeruginosa</i>	Cy5	650	670

В процедуре проведения экспериментов можно выделить несколько основных этапов: фиксация клеток бактерий в растворе формальдегида в фосфатно-физиологическом буфере с последующей отмывкой той же буферной системой, гибридизация с флуоресцентно-мечеными LNA зондами, отмывка препаратов от не связавшихся зондов после гибридизации. Далее образцы наносили на подготовленную стеклянную поверхность и посредством метода флуоресцентной микроскопии получали изображения бактериальных клеток. Для этого регистрировали флуоресцентный сигнал в каналах проходящего света и флуоресцентных каналах (фильтры GFP, Cy3, Cy5; микроскоп Axiovert 200 M и EVOS FL Auto 2 Imaging System). Общее время, затраченное на выполнение операций, предшествующих флуоресцентному микроскопированию, составило 4 часа.

Для доказательства отсутствия ложноположительных сигналов при проведении опытов по гибридизации как с одним зондом, так и с двумя одновременно были исследованы отрицательные контрольные образцы, которые представляли собой клетки бактерий, инкубированные в гибридизационном буфере без флуоресцентных LNA зондов (рис. 1). При анализе данных, полученных после выполнения ряда экспериментов по гибридизации, был сделан вывод о специфичности связывания флуоресцентно-меченых зондов с клетками прокариот, поскольку зарегистрированные флуоресцентные сигналы не перекрывались при получении изображений в разных каналах (рис. 2).

Полученные результаты позволяют выявить бактерии определенного вида и провести оценку их количества, что потребует в дальнейшем исключения человеческого фактора за счет информационно-аппаратных средств для автоматизации и создания мультиплексной системы для детекции патогенов.

Литература:

1. Giacomini M.G., Lopes M.V.C.A., Gandolfi J.V. et al. Septic shock: a major cause of hospital death after intensive care unit discharge // Rev. Bras. Ter. Intensiva. 2015. Vol. 27. № 1. P. 51-56.
2. Grumaz S., Stevens P., Grumaz C. et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients // Genome Medicine. 2016. Vol. 8. № 73. P. 1-13.
3. Соловьева М.Н., Гудов В.П., Ткачук А.П., Гушин В.А. Обнаружение бактериальных патогенов методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием LNA зондов // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 23-25 мая 2018 г.). 2018. С. 345-348.
4. Rohde A., Hammerl J.A., Al Dahouk S. Detection of foodborne bacterial zoonoses by fluorescence *in situ* hybridization // Food Control. 2016. Vol. 69. P. 297-305.
5. Procop G.W. In situ hybridization for the detection of infectious agents // Clinical Microbiology Newsletter. 2002. Vol. 24. № 16. P. 121-125.
6. 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.

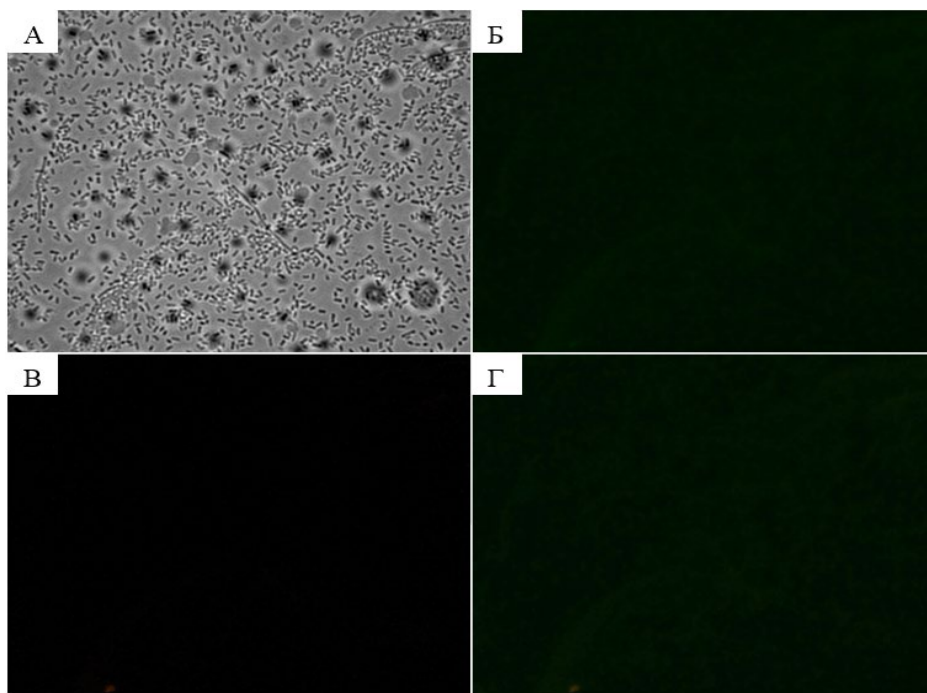


Рис.1. Результаты эксперимента отрицательного контроля с клетками *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*. А – снимок в канале проходящего света; Б – в GFP канале; В – в канале Cy5; Г – совмещенное изображение.

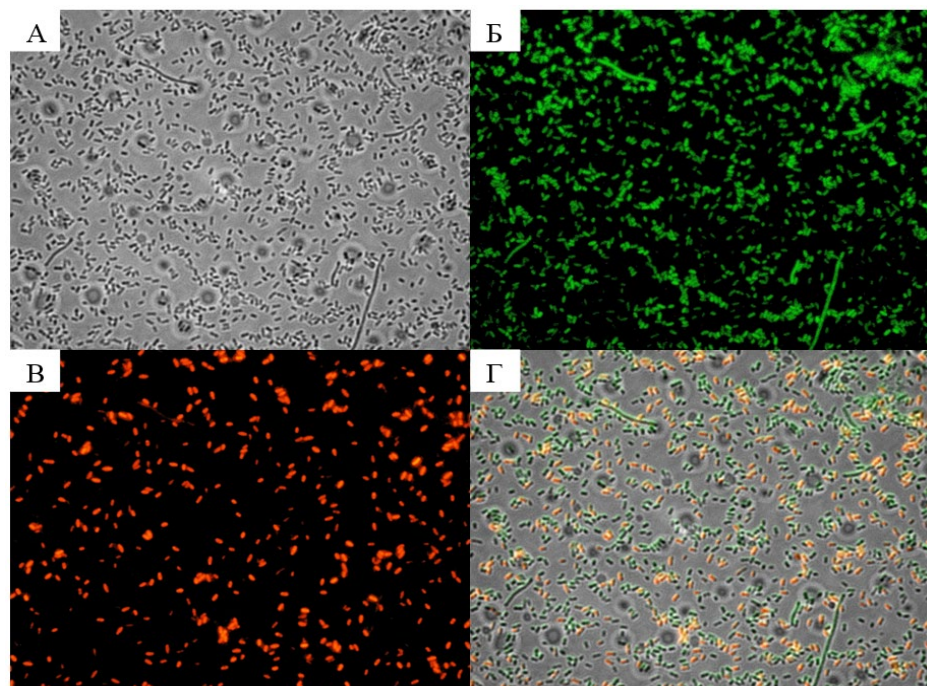


Рис. 2. Пример результатов эксперимента с клетками *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* и зондами к клеткам *E. coli* и *P. aeruginosa*. А – снимок в канале проходящего света; Б – в GFP канале; В – в канале Cy5; Г – совмещенное изображение.

UDC 543.95, 57.083.18

IN-SITU HYBRIDIZATION. RAPID QUANTITATIVE DETECTION AND TYPING OF BACTERIAL PATHOGENS

Solovyova M.N., Gudov V.P., Tkachuk A.P., Gushchin V.A.

The Federal State Budgetary Institution "National Research Center of 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

Experimental work on the hybridization of fluorescently-labeled LNA probes to the rRNA of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* cells was carried out, the specificity of the binding used probe was studied. Fluorescence detection was performed using the fluorescence microscopy method, while the absence of false-positive signals was shown.

Key words: fluorescence *in situ* hybridization (FISH), locked nucleic acids (LNA), bacterial pathogens

Often in clinical practice it is necessary to solve issues related to the rapid and accurate determination of the bacterial load on the human body, where species of microorganism and its quantity are important to know. This assay is required both during the therapeutic examination and in preparing the patient for surgery, for example, to prevent septic shock, which in 25–50% of cases is fatal [1].

Microbiological blood culture and PCR/PCR-RT are the most commonly used methods for determining pathogens, but these are laborious and time-consuming processes, which often lead to false-negative results. In this regard, it is necessary to develop approaches that do not require the cultivation of microorganisms, or the extraction of the DNA for replication *in vitro* [2]. To solve these problems, the use of the method of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is promising, which makes it possible to detect bacterial pathogens by binding fluorescently-labeled LNA probes to ribosomal RNA (rRNA) of the target agents [3-6].

The aims of the present work were to testing the FISH protocol and study the specificity of the binding fluorescently-labeled LNA probes to 16S, 23S RNA *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* complementary fragments. For this, a number of experiments on the hybridization of LNA probes to rRNA of the corresponding bacterial strains was carried out under the conditions of the presence of probes to either one type of prokaryote or two types simultaneously. Fluorescent labels immobilized on the 5'- or 3'-end of the probes, were selected so that the maxima of their absorption and emission of light did not overlap each other (Table 1).

Table 1. Characteristics of the fluorophores used in LNA probes.

Bacteria cells	Fluorophore	Excitation maximum, nm	Emission maximum, nm
<i>E. coli</i>	FAM	495	520
<i>S. typhimurium</i>	ROX	580	605
<i>P. aeruginosa</i>	Cy5	650	670

The procedure of the experiments can be divided into several basic steps: fixation bacterial cells in formaldehyde solution in phosphate-physiological buffer followed by washing with the same buffer system, hybridization with fluorescently-labeled LNA probes, washing preparation from unbound probes after hybridization. Then the samples were coated to the prepared glass surface and images of bacterial cells were obtained using the fluorescence microscopy method. A fluorescent signal was saved in the transmitted light channels and fluorescent channels (GFP, Cy3, Cy5 filters; Axiovert 200 M microscope and EVOS FL Auto 2 Imaging System). The total time spent on performing operations prior to fluorescence microscopy was 4 hours.

For validation the absence of false-positive signals, when conducting experiments on hybridization with one probe or with two, negative control samples, which were bacterial cells incubated in a hybridization buffer without fluorescent LNA probes, were examined (Fig. 1). When analyzing the data obtained after performing a series of experiments on hybridization, it was concluded that the binding of fluorescently-labeled probes with prokaryotic cells is specific, since

the recorded fluorescent signals did not overlap when obtained images in different channels (Fig. 2).

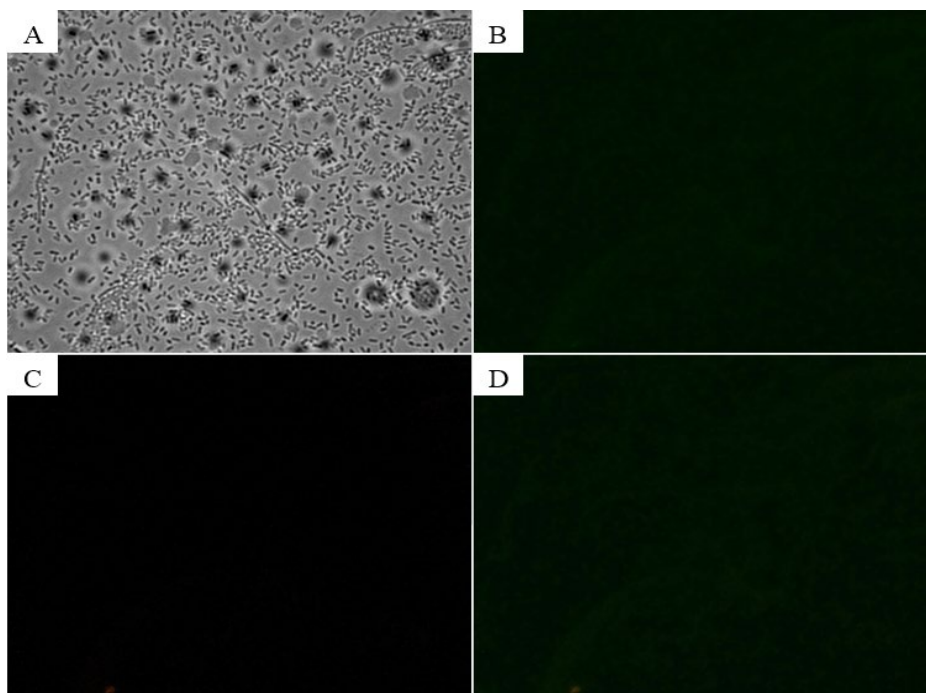


Fig. 1. Results of negative control experiment with *E. coli*, *S. typhimurium* and *P. aeruginosa* cells. A – images in transmitted light; B – in GFP channel; C – in Cy5 channel; D – combined image.

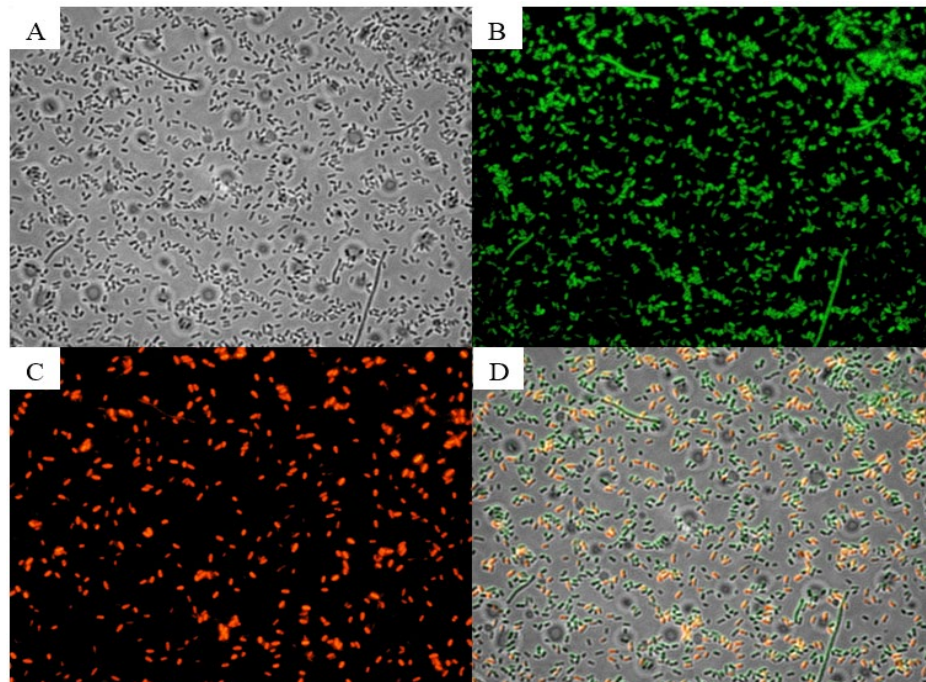


Fig. 2. Example of experimental results with *E. coli*, *S. typhimurium* and *P. aeruginosa* cells and probes to cells of *E. coli* and *P. aeruginosa*. A – images in transmitted light; B – in GFP channel; C – in Cy5 channel; D – combined image.

The obtained results make it possible to find bacteria of a certain type and to estimate their amount, which will require further exclusion of the human factor with help information-hardware tools for automation and development of a multiplex system for the detection of pathogens.

References:

1. Giacomini M.G., Lopes M.V.C.A., Gandolfi J.V. et al. Septic shock: a major cause of hospital death after intensive care unit discharge // *Rev. Bras. Ter. Intensiva*. 2015. Vol. 27. № 1. P. 51-56.
2. Grumaz S., Stevens P., Grumaz C. et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients // *Genome Medicine*. 2016. Vol. 8. № 73. P. 1-13.
3. Solovyova M.N., Gudov V.P., Tkachuk A.P., Gushchin V.A. Detection of bacterial pathogens using fluorescent in situ hybridization with LNA probes // *Materials of the international forum «Biotechnology: state and prospects of development»* (Moscow, may 23-25, 2018). 2018. P. 345-348.
4. Rohde A., Hammerl J.A., Al Dahouk S. Detection of foodborne bacterial zoonoses by fluorescence in situ hybridization // *Food Control*. 2016. Vol. 69. P. 297-305.
5. Procop G.W. In situ hybridization for the detection of infectious agents // *Clinical Microbiology Newsletter*. 2002. Vol. 24. № 16. P. 121-125.
6. 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.

УДК 615.074:614.7

ГИБРИДНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ КАК МЕТОД ГРУППОВОГО РАСПОЗНАВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНАЛИТОВ И ИХ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ

Буркин М.А., Нуриев Р.И., Гальвидис И.А.

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
e-mail: burma68@yandex.ru

В докладе обсуждается принцип нового гибридного формата анализа, разработанного на основе конкурентного одностадийного сэндвич иммуноферментного анализа в качестве альтернативного подхода для определения широкого спектра структурно родственных аналитов.

Ключевые слова: гибридный иммуноанализ; групповая специфичность; сульфаниламидные препараты

Развитие биоаналитических методов мультidetекции связано со значительным разнообразием природных и синтетических субстанций, которые в силу своей биологической активности представляют интерес для медицины, сельского хозяйства и биотехнологических процессов. Активное применение этих химических соединений и их распространение в окружающей среде требует контроля безопасности и ограничения негативного воздействия на людей, животных и экосферы в целом. Многие из этих аналитов объединены в группы структурных аналогов, производных и активных метаболитов. Их общие молекулярные детерминанты служат удобной мишенью для создания антител, способных распознавать сразу несколько аналогов, обладающих данным признаком. Тем не менее, с помощью одних антител не всегда удается выявлять весь необходимый спектр представителей группы соединений. Существенного расширения специфичности анализа можно достичь посредством объединения нескольких взаимодополняющих друг друга по спектру распознавания антител в едином гибридном анализе. В соответствии с этой стратегией на основе двух антител к сульфаниламидным препаратам был разработан новый формат сэндвич-ИФА с двойной конкуренцией. Объединение аналитических потенциалов обоих антител позволило расширить специфичность гибридного анализа и выявлять суммарно 14 сульфаниламидов в молоке и мясе птицы при их максимально допустимом содержании [1].

Литература:

1. I.A. Galvidis, Z. Wang, R.I. Nuriev, M.A. Burkin. Broadening the detection spectrum of small analytes using a two-antibody-designed hybrid immunoassay // *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90. № 7. P. 4901–4908.

UDC 615.074:614.7

HYBRID IMMUNOASSAY AS A GROUP RECOGNITION METHOD FOR LOW MOLECULAR WEIGHT ANALYTES AND THEIR STRUCTURAL ANALOGUES

Burkin M.A., Nuriev R.I., Galvidis I.A.

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Russia, Maliy Kazionniy per. 5a, Moscow, 105064, Russia;
e-mail: burma68@yandex.ru

The principle of a novel hybrid format of assay developed on the basis of competitive single-stage sandwich enzyme immunoassay is discussed in the report as an alternative approach for determination of a broad range of structurally related analytes.

Key words: hybrid immunoassay; group specificity; sulfonamides

The development of bioanalytic multidetection methods is associated with a significant variety of natural and synthetic substances, which due to their biological activity are of interest to medicine, agriculture and biotechnology processes. The active use of these chemical compounds and their distribution in the environment requires monitoring of biosafety and limitation of possible negative impact on people, animals and the ecosphere as a whole. Many of these analytes, derivatives and active metabolites are combined into groups of structural analogues. Their common molecular determinants serve as a convenient target for the development of antibodies capable of recognizing several analogues with this feature. However, it is not always possible to reveal all the necessary representatives from the group of compounds using the single antibody. A significant expansion of the specificity of the assay can be achieved by combining several antibodies with mutually complementary recognition spectra in a single hybrid analysis. According to this strategy, a novel sandwich double-competitive ELISA has been developed on the basis of two sulfonamide antibodies. The combination of analytical potentials of both antibodies allowed to expand the specificity of assay and to detect a total of 14 sulfonamides in milk and poultry muscle at their maximum residue limit [1].

References:

1. I.A. Galvidis, Z. Wang, R.I. Nuriev, M.A. Burkin. Broadening the detection spectrum of small analytes using a two-antibody-designed hybrid immunoassay // *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90. № 7. P. 4901–4908.

УДК: 543.94

ГОМОГЕННЫЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ III С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЕРОКСИДАЗА-ПОДОБНОГО ДНКЗИМА

К.М.Буркин, О.Л.Бодулев, И.Ю.Сахаров

Химический Факультет, МГУ имени М. В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские Горы, 1, стр.3,
e-mail: burkin-kost@yandex.ru; bodulevoleg@mail.ru; sakharovivan@gmail.com

Разработан хемилюминесцентный количественный метод определения экзонуклеазы III – одного из ключевых ферментов в функционировании клеток. Оптимизированные условия проведения реакции позволили определять до 0.01 Ед/мл экзонуклеазы III.

Ключевые слова: экзонуклеаза III, хемилюминесценция, гидролиз

Экзонуклеаза III (экз III) отщепляет последовательно мононуклеотиды с «тупого» 3'-конца двуспиральных ДНК. Такие ферменты как экз III играют важную роль в клеточных процессах, которые необходимы для поддержания стабильности генома. Ее избыток или отсутствие приводит к появлению тяжелых заболеваний. Также экз III часто используется в работах по созданию амплификационных методов анализа нуклеиновых кислот. В связи с этим необходимо иметь простой, чувствительный и дешевый метод регистрации активности этого фермента. В данной работе разработан хемилюминесцентный метод анализа, где в качестве субстрата экз III используется олигонуклеотид,

формирующий структуру шпильки с тупым концом. В присутствии экз III часть шпильки гидролизует, в результате чего высвобождается последовательность аптамера гемина EAD2, который формирует G-квадруплекс, образуя с гемом пероксидаза-подобный ДНКзим. Каталитическая активность последнего определялась в присутствии люминола и пероксида водорода. Условия для определения ферментативной активности экз III были оптимизированы при варьировании структуры олигонуклеотидных субстратов, температуры и времени ферментативного гидролиза и концентрации хлорида магния, субстрата и гемина. В оптимизированных условиях данный хемилюминесцентный анализ позволяет определить экз III до 0.01 Ед/μл. Проведено сравнение аналитических параметров разработанного метода с колориметрической и хемилюминесцентной детекцией.

Был создан хемилюминесцентный анализ определения экзонуклеазы III на основе формирования пероксидаза-подобного ДНКзима. В оптимизированных условиях данный анализ позволяет определить до 0.01 Ед/μл экзонуклеазы III.

Данная работа была поддержана Российским Научным Фондом (17-14-01042).

UDC: 543.94

HOMOGENEOUS CHEMILUMINESCENT METHOD FOR THE DETERMINATION OF EXONUCLEASE III USING PEROXIDASE-MIMICKING DNAZYME

K.Burkin, O.Bodulev, I.Sakharov

Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119234, Moscow, Leninskie Gory, 1
e-mail: burkin-kost@yandex.ru; bodulevoleg@mail.ru; sakharovivan@gmail.com

A chemiluminescent assay has been developed for the determination of exonuclease III, one of the main enzymes for cell functioning. Optimized reaction conditions allowed to determine up to 0.01 U / μl of exonuclease III.

Key words: exonuclease III, chemiluminescence, hydrolysis

Exonuclease III (exo III) hydrolyzes sequentially mononucleotides from the blunt 3'-end of double-stranded DNA. Enzymes like exo III play an important role in cellular and physiological processes that are necessary to maintain genome stability. Its excess or absence leads to the serious diseases. Also, exo III is often used in the development of amplification assays of nucleic acids. In this regard, it is necessary to have a simple, sensitive and cheap methods to detect the activity of this enzyme. In this work, a chemiluminescent assay was developed, where a hairpin oligonucleotide with a blunt end was used as a substrate of exo III. In the presence of exo III, one of stem chains of the hairpin is hydrolyzed, thereby producing the hemin aptamer EAD2. The obtained sequence has G-quadruplex structure, which, after its interaction with hemin, produces peroxidase-mimicking DNAzyme. The catalytic activity of DNAzyme was estimated towards luminol and hydrogen peroxide. The conditions of determining enzyme activity of exo III were optimized by varying the structure of oligonucleotide substrates, the temperature and time of the enzyme hydrolysis, the concentration of MgCl₂, the substrate and hemin. Under favorable conditions the proposed chemiluminescent assay of exo III allows to determine up to 0.01 U/μl. The analytical parameters of the developed method are compared using colorimetric and chemiluminescent detection.

A chemiluminescent analysis of exonuclease III based on the formation of peroxidase-like DNAzyme was created. Under optimized conditions, this analysis allows to determine up to 0.01 U / μl of exonuclease III.

This work was supported by the Russian Science Foundation (17-14-01042).

УДК 543.9

ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТРОПОНИНА Т

Сафенкова И.В., Иванов А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

119071 Москва, Ленинский проспект, д.33

e-mail: irina.safenkova@gmail.com

Впервые предложен метод анализа, включающий иммунное распознавание аналита на поверхности магнитных наночастиц и изотермическую амплификацию (рекомбиназная полимеразная амплификация) сигнальной последовательности ДНК. Использование метода для детекции тропонина Т в сыворотке обеспечивает анализ за 2 часа с пределом обнаружения 12 пг/мл.

Ключевые слова: изотермическая амплификация ДНК, иммуноанализ, иммуно-ПЦР, рекомбиназная полимеразная амплификация, тропонин Т

Иммуноанализ является эффективным и широко распространенным методом обнаружения биомолекул. Высокая аффинность и специфичность иммунного распознавания обеспечивают преимущества диагностики во многих областях, включая медицину, сельское хозяйство, мониторинг окружающей среды и контроль качества и безопасности пищевых продуктов. Однако для решения многих практических задач крайне важно улучшение чувствительности иммуноанализа. Одним из перспективных подходов для достижения этой цели является сочетание иммунного распознавания и амплификации сигнальной последовательности ДНК последовательности. Нами впервые предложено использовать рекомбиназную полимеразную амплификацию (РПА) в сочетании с иммуноанализом (иммуно-РПА). РПА является уникальным методом изотермической амплификации благодаря тому, что реализуется при 37 °С и требует только одну пару праймеров и матрицу ДНК.

На примере иммуноанализа сердечной изоформы тропонина Т (сTnT), одного из диагностически значимых биомаркеров острого инфаркта миокарда, показана эффективность предложенного иммуно-РПА метода. В работе использовали специфичные к сTnT моноклональные антитела двух типов и рекомбинантный сTnT (Биалекса, Россия). Иммунохимический этап анализа проводили в «сэндвич»-формате. Для этого первые антитела ковалентно иммобилизовали на поверхности магнитных наночастиц (Magsphere, США), а вторые антитела биотинилировали. Анализ включал следующую последовательность взаимодействий: конъюгаты магнитных наночастиц с антителами блокировали для предотвращения неспецифического связывания, затем добавляли пробу, содержащую сTnT, после инкубации иммунные комплексы конъюгатов магнитных наночастиц отделяли с использованием магнитных штативов, отмывали и последовательно инкубировали с биотинилированными антителами, далее со стрептавидином и с сигнальной биотинилированной ДНК (ген eGFP). Затем ДНК отделяли от иммунного комплекса тепловой денатурацией. Полученную ДНК амплифицировали методом РПА, используя набор фирмы Twist Dx, Великобритания. Для детекции в РПА использовали меченный карбоксифлуоресцеином зонд; флуоресценцию измеряли в амплификаторе Light Cycler 96 (Roche, США).

Разработанный иммуно-РПА обеспечивал детекцию сTnT в разведенной сыворотке с пределом обнаружения 12 пг/мл в течение 2 часов. Полученный предел обнаружения ниже по сравнению с классическим иммуноферментным анализом (520 пг/мл) и иммуноанализом в сочетании с амплификацией полимеразной цепной реакцией (иммуно-ПЦР) (21 пг/мл). Предложенная концепция иммуно-РПА обладает значительным преимуществом по сравнению с иммуно-ПЦР методами благодаря изотермическим условиям при 37 °С и сокращению времени анализа. Кроме того, перспективность реализованного подхода определяется упрощением детектирующих приборов. Сочетание иммунодетекции и РПА имеет большой потенциал для развития и разработки новых высокочувствительных методов анализа.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-6712.2018.4.

UDC 543.9

ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA AS A WAY TO INCREASE THE SENSITIVITY OF IMMUNOASSAY FOR TROPONIN T DETECTION

Safenkova I.V., Ivanov A.V., 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*

We first proposed a method of analysis including the immune recognition of an analyte on the surface of magnetic nanoparticles and isothermal amplification (recombinase polymerase amplification) of the signal DNA. Using the method for the detection of troponin T in serum provides detection limit of 12 pg/ml for 2 hours.

Key words: immunoassay, immunoPCR, isothermal amplification of DNA, recombinase polymerase amplification, troponin T

Immunoassay is an effective and widely used method for the detection of biomolecules. The high affinity and specificity of immune recognition provide diagnostic benefits in many areas, including medicine, agriculture, environmental monitoring, and food quality and safety control. However, to solve many practical problems the improve of the immunoassay sensitivity is extremely important. One of the promising approaches to achieve this goal is a combination of immune recognition and amplification of the signal DNA. We first proposed the use of recombinase polymerase amplification (RPA) in combination with an immunoassay (immunoRPA). RPA is a unique method of isothermal amplification because it is carried out at 37 °C and requires only one pair of primers and a DNA template.

An example of the immunoassay for cardiac troponin T (cTnT), one of the diagnostically significant biomarkers of acute myocardial infarction, shows the effectiveness of the proposed immunoRPA. Two types of monoclonal antibodies specific to cTnT and recombinant cTnT (Bialexa, Russia) were used. The immunochemical stage of the analysis was performed in a "sandwich" format. For this, the first antibodies were covalently immobilized on the surface of magnetic nanoparticles (Magsphere, USA), the second antibodies were biotinylated. The analysis included the following sequence of interactions: conjugates of magnetic nanoparticles with antibodies were blocked to prevent non-specific binding, then a sample containing cTnT was added, after incubation, the immune complexes of magnetic conjugates were separated using magnetic field, washed and subsequently incubated with biotinylated antibodies, then with streptavidine and biotinylated DNA (eGFP gene). Then the DNA was separated from the immune complex by thermal denaturation. The obtained DNA was amplified by the RPA method, using the kit from Twist Dx, United Kingdom. A carboxyfluorescein-labeled probe was used for detection in the RPA. Fluorescence was measured in a Light Cycler 96 amplifier (Roche, USA).

The developed immunoRPA provided detection of cTnT in diluted serum with a detection limit of 12 pg/ml for 2 hours. The obtained detection limit is lower compared with ELISA (520 pg/ml) and immunoassay in combination with amplification by polymerase chain reaction (immunoPCR) (21 pg/ml). The proposed concept of immunoRPA has a significant advantage compared to immunoPCR methods, due to isothermal conditions at 37 °C and reduced analysis time. In addition, the promise of the implemented approach is determined by the simplification of the detection devices. The combination of immunodetection and RPA has great potential for the development of new highly sensitive methods of analysis.

This study was financially supported by the RF President grants for state support of young russian scientists – PhD (MK-6712.2018.4).

УДК 57.083.3

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕСТРУКТУРНЫХ АНТИГЕНОВ

Муканов К.К., Ескендирова С.З., Раманкулов Е.М., Мукантаев К.Н.

РГП «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Казахстан
010000, Астана, ул. Кургальжинское шоссе, 13/5
e-mail: mukanov@biocenter.kz

Получены рекомбинантные 2С, 3А, 3В, 3D и 2С3АВ неструктурные антигены вируса ящура. На основе рекомбинантных антигенов разработан иммунохроматографический анализ для дифференциальной диагностики ящура.

Ключевые слова: вирус, ящур, иммунохроматографический анализ, тест-система

Ящур относится к группе особо опасных вирусных заболеваний сельскохозяйственных животных и наносит значительный экономический ущерб. Значимость диагностики данной инфекции связано с такими биологическими свойствами вируса как быстрое распространение среди восприимчивых животных и высокая вирулентность возбудителя.

Важными диагностическими антигенами для дифференциации вирусоносителей среди вакцинированного стада являются неструктурные антигены вируса ящура. По данным многих авторов, антитела к неструктурным антигенам вируса ящура присутствуют в сыворотке только зараженных животных, но не вакцинированных [1, 2, 3]. На основе неструктурных антигенов разработаны несколько вариантов иммуноферментного анализа, направленные на дифференциацию инфицированных животных среди вакцинированных животных. Все эти тесты основаны на обнаружении антител к неструктурным антигенам вируса ящура.

За последние годы с развитием нанотехнологии все большую популярность приобретает иммунохроматографический анализ. Принцип иммунохроматографического анализа состоит в том, что при погружении тест-полоски в биологическую жидкость, она начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. Вместе с ней движутся нанесенные на нижнюю часть тест-полоски меченые коллоидным золотом специфические антитела, которые аффинно связываются с анализируемым веществом.

В результате проведенных исследований получены рекомбинантные 2С, 3А, 3В, 3D и 2С3АВ неструктурные белки вируса ящура. Молекулярная масса полученных рекомбинантных 2С, 3А, 3В, 3D и 2С3АВ антигенов составило 37, 28, 38, 34 и 50 кДа, соответственно. Полученные рекомбинантные антигены специфически реагировали с контрольными положительными сыворотками. Разработана иммунохроматографическая тест-система на основе рекомбинантных 2С, 3А, 3В и 3D неструктурных антигенов вируса ящура. Произведена опытная партия тест-системы в количестве 20 наборов и проведена апробация тест-систем. Для определения диагностической эффективности тест-системы было использовано 90 проб сывороток от вакцинированных животных, 100 проб от здоровых не вакцинированных животных и 25 положительных контрольных сывороток. Анализ тест-системы показал, что специфичность тест-системы по 2С антигену составила – 95%, по 3А антигену – 96%, по 3В антигену – 95%, по 3D антигену – 91%. Чувствительность тест-системы по 2С антигену составила – 92%, по 3А антигену – 97%, по 3В антигену – 92% и по 3D антигену – 97%. На основе полученных результатов подготовлена нормативно-техническая документация на производство тест-системы и направлена в МСХ РК для проведения экспертизы и согласования.

Литература:

1. Biswal J. K., Jena S., Mohapatra J. K., Bisht P., Pattnaik B. Detection of antibodies specific for foot-and-mouth disease virus infection using indirect ELISA based on recombinant nonstructural protein 2B // *Archives of Virology Journal*. – 2014. – Vol.159. – P.1641-1650.
2. Mahajan S., Mohapatra J. K., Pandey L. K., Sharma G. K., Pattnaik B. Truncated recombinant non-structural protein 3B-based indirect ELISA for FMD sero-surveillance // *Journal of Virology Methods*. – 2013. – Vol.193. – P.405-414.
3. Gao M., Zhang R., Li M., Li S., Cao Y., Ma B., Wang J. An ELISA based on the repeated foot-and-mouth disease virus 3B epitope peptide can distinguish infected and vaccinated cattle // *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*. – 2012. – Vol.93. – P.1271-1279.

UDC 57.083.3

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR DETECTION OF FMDV BY RECOMBINANT NON-STRUCTURAL ANTIGENS

Mukanov KK, Eskendirova S.Z., Ramankulov EM, Mukantaev K.N.

RSE "National Center for Biotechnology" Committee of Science, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Kazakhstan
010000, Astana, Kurgalzhinskoe road, 13/5
e-mail: mukanov@biocenter.kz

Recombinant 2C, 3A, 3B, 3D and 2S3AB nonstructural antigens of FMD virus obtained. By on recombinant antigens, an immunochromatographic assay has been developed for the differential diagnosis of FMD.

Key words: virus, FMD, immunochromatographic analysis, assay

Foot and mouth disease (FMD) belongs to the group of infectious viral diseases of domestic animals. It is often considered as an economic disease because of economic harm it causes. The importance of its timely detection is explained by the rapid spread of the virus among susceptible animals and high virulence of the pathogen.

Important diagnostic antigens for differentiation of carriers of foot-and-mouth disease virus among vaccinated herds are non-structural antigens of FMD virus. According to the earlier studies, antibodies to nonstructural antigens of FMDV are present in the serum of infected not vaccinated animals only [1, 2, 3]. Based on nonstructural antigens, several variants of immunoassay were developed, aimed at differentiating infected animals among vaccinated animals. All of these assays are based on the detection of antibodies to non-structural antigens of the foot and mouth disease virus.

In recent years, with the development of nanotechnology, immunochromatographic analysis has become increasingly popular. The principle of immunochromatographic analysis is similar to thin-layer chromatography. When the test strip is immersed in a biological fluid, the fluid begins to migrate along the strip. There are specific antibodies labeled with colloidal gold and have an affinity to the analyte.

As a result of the research, recombinant 2C, 3A, 3B, 3D and 2C3AB non-structural proteins of FMDV were obtained. The molecular weight of the obtained recombinant 2C, 3A, 3B, 3D, and 2C3AB antigens was 37, 28, 38, 34 and 50 kDa, respectively. The resulting recombinant antigens specifically reacted with control positive sera. An immunochromatographic assay based on recombinant 2C, 3A, 3B and 3D nonstructural antigens of FMDV was developed. An experimental batch of the assay was produced in an amount of 20 sets, and testing of assays was carried out. To determine the diagnostic efficacy of the assay, 90 samples of sera from vaccinated animals, 100 samples from healthy unvaccinated animals and 25 positive control sera were used. Analysis of the assay showed that the specificity for 2C antigen was 95%, for 3A antigen – 96%, for 3B antigen – 95%, for 3D antigen – 91%. The sensitivity of the assay for 2C antigen was 92%, for 3A antigen - 97%, for 3B antigen - 92% and for 3D antigen - 97%. By the obtained results, regulatory and technical documentation for the production of the assay was prepared for the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan for the examination and approval.

References:

1. Biswal J. K., Jena S., Mohapatra J. K., Bisht P., Pattnaik B. Detection of antibodies specific for foot-and-mouth disease virus infection using indirect ELISA based on recombinant nonstructural protein 2B // *Archives of Virology Journal*. – 2014. – Vol.159. – P.1641-1650.
2. Mahajan S., Mohapatra J. K., Pandey L. K., Sharma G. K., Pattnaik B. Truncated recombinant non-structural protein 3B-based indirect ELISA for FMD sero-surveillance // *Journal of Virology Methods*. – 2013. – Vol.193. – P.405-414.
3. Gao M., Zhang R., Li M., Li S., Cao Y., Ma B., Wang J. An ELISA based on the repeated foot-and-mouth disease virus 3B epitope peptide can distinguish infected and vaccinated cattle // *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*. – 2012. – Vol.93. – P.1271-1279.

УДК 543.066; 57.083.3

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ НАНОДИСПЕРСНЫХ МАРКЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ: ПУТИ СНИЖЕНИЯ ПРЕДЕЛА ДЕТЕКЦИИ

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 требования к наночастицам – маркерам и носителям в иммунохроматографических тест-системах. Исходя из этих требований, охарактеризованы способы повышения чувствительности иммунохроматографии, основанные на замене маркеров, выборе оптимальных размеров наночастиц и поверхностной плотности иммобилизуемых на них антител, формировании агрегатов из функционализированных наночастиц.

Ключевые слова: иммунохроматография, предел детекции, конъюгаты наночастица-антитело, агрегация наночастиц

Иммунохроматографические тест-системы широко используются в современной аналитической практике вследствие быстрого нетрудоемкого проведения тестирования и простоты визуальной оценки результатов – связывания окрашенных наночастиц, маркеров и носителей иммунореагентов, в определенных участках тест-полоски. Однако это ускорение и упрощение анализа в традиционных форматах иммунохроматографии сопровождается потерями в чувствительности по сравнению с традиционными иммуноаналитическими методами. В докладе представлены результаты разработок высокочувствительных иммунохроматографических тест-систем, основанных на выборе наиболее эффективных используемых наночастиц, их комплексов с антителами и образующихся в ходе анализа комплексов функционализированных наночастиц разных типов.

Рассмотрены математические модели различных форматов иммунохроматографии – конкурентного анализа, сэндвич-анализа, серодиагностики. Определены условия, в которых именно свойства маркера становятся фактором, лимитирующим снижение предела детекции. Предложен набор параметров, значения которых позволяют осуществлять сравнительную оценку различных наночастиц как иммунохроматографических маркеров. Охарактеризованы преимущества флуоресцентных нанодисперсных маркеров – квантовых точек – в конкурентном и неконкурентном иммуноанализе. Экспериментально и теоретически охарактеризовано влияние размеров наночастиц и соотношения антитело:наночастица в конъюгатах на предел детекции иммунохроматографии. Рассмотрены различные варианты усиления сигнала в иммунохроматографии, основанные на формировании в ходе анализа агрегатов функционализированных наночастиц – наночастиц золота с разными иммобилизованными реагентами, сочетания наночастиц золота и магнетита. Показана эффективность предлагаемых подходов для систем детекции низкомолекулярных моновалентных антигенов (микотоксины, антибиотики) и корпускулярных поливалентных антигенов (вирусы, бактерии), обеспечивающих снижение предела детекции на один-два порядка.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-08-01397).

UDC 543.066; 57.083.3

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SYSTEMS WITH DIFFERENT NANOLABELS AND THEIR COMPLEXES: WAYS TO REDUCE THE DETECTION LIMIT

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*

Requirements to nanoparticles, labels and carriers in immunochromatographic test systems, have been considered. Using these requirements, the methods for increasing the sensitivity of immunochromatography have been characterized that are based on changes of the labels, the choice of the optimal size of nanoparticles and the surface density of antibodies immobilized on them, the formation of aggregates of functionalized nanoparticles.

Key words: immunochromatography, limit of detection, nanoparticle-antibody conjugates, aggregation of nanoparticles

Immunochromatographic test systems are widely used in modern analytical practice due to fast, easy testing and simple visual assessment of its results as binding of colored nanoparticles (labels and carriers of immunoreagents) in certain parts of a test strip. However, this acceleration and simplification in traditional formats of immunochromatography is accompanied by a loss in sensitivity compared with traditional immunoassay methods. The report presents the results of the development of highly sensitive immunochromatographic test systems, based on the choice of the most effective nanoparticles, their complexes with antibodies and complexes of different kinds of functionalized nanoparticles formed during the analysis.

Mathematical models of various immunochromatographic formats are considered, namely competitive assays, sandwich assays, and serodiagnosis. The conditions are determined for which exactly the properties of the label become the factor determining the detection limit of the tests. A set of parameters is proposed, the values of which allow a comparative assessment of various nanoparticles as immunochromatographic labels. The advantages of fluorescent nanodispersed labels, quantum dots, in competitive and non-competitive immunoassays are characterized. The effect of nanoparticle size and the ratio of antibody: nanoparticle in conjugates on the detection limit of immunochromatography was characterized theoretically and experimentally. Various variants of signal amplification in immunochromatography, based on the formation during the analysis of aggregates of functionalized nanoparticles – gold nanoparticles with different immobilized reagents, combinations of gold and magnetite nanoparticles – are considered. The effectiveness of the proposed approaches for detection of low molecular weight monovalent antigens (mycotoxins, antibiotics) and polyvalent corpuscular antigens (viruses, bacteria), which reduce the detection limit by one or two orders of magnitude, is shown.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant 18-08-01397).

УДК 57.083.3

МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ЯМР-АНАЛИЗА: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

Храмцов П.В., Баркина И.А., Кропанева М.Д., Бызов И.В., Минин А.С., Мысик А.А., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Уймин М.А., Заморина С.А., Ермаков А.Е., 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: khramtsovpavel@yandex.ru*

Разработан метод конъюгирования магнитных железоуглеродных наночастиц с биомолекулами. Принцип метода состоит в получении стабильных суспензий наночастиц, покрытых различными белками, с последующей ковалентной пришивкой распознающих молекул. Исследованы свойства наночастиц и продемонстрировано их применение в ЯМР-анализе.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, ядерно-магнитный резонанс, иммуноанализ

В настоящее время магнитные наночастицы используются для создания систем анализа, основанных на принципе ядерно-магнитного резонанса (ЯМР). Магнитные наночастицы обладают способностью влиять на время релаксации близлежащих протонов. Измерение времени релаксации дает возможность осуществить количественную оценку содержания магнитных наночастиц на поверхности иммуносорбента, что лежит в основе разработки твердофазных тест-систем.

В ходе работы были синтезированы стабильные конъюгаты железоуглеродных наночастиц (железное ядро-углеродная оболочка) с распознающими молекулами: моноклональными антителами и стрептавидином [1]. Стабильность наночастиц в водных растворах достигалась при помощи покрытия их поверхности различными инертными белками: казеином, желатином, альбумином, к которым ковалентно присоединяли распознающие молекулы. Была продемонстрирована возможность управления размерами конъюгатов, проведена оценка их физико-химических свойств. Синтезированные конъюгаты были использованы для прямой и сэндвич-детекции белков в твердофазном ЯМР-анализе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 17-15-01116.

Литература:

1. Khramtsov P., Kropaneva M., Byzov I., Minin A., Mysik A., Timganova V., Bochkova M., Uimin M., Zamorina S., Yermakov A., Rayev M., *Conjugation of carbon coated-iron nanoparticles with biomolecules for NMR-based assay// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019. V. 176. P. 256-264.

UDK 57.083.3

MAGNETIC NANOPARTICLES FOR NMR-BASED ASSAY: PREPARATION, PROPERTIES AND APPLICATION

Khramtsov P.V., Barkina I.A., Kropaneva M.D., Byzov I.V., Minin A.S., Mysik A.A., Bochkova M.S., Timganova V.P., Uimin M.A., Zamorina S.A., Yermakov A.E., Rayev M.B.

*Laboratory of ecological immunology, «Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms», Perm, Russia
614081, 13, Golev str., Perm
e-mail: khramtsovpavel@yandex.ru*

A method for conjugating magnetic iron-carbon nanoparticles with biomolecules has been developed. The principle of determination consists in obtaining stable nanoparticle suspensions. The properties of nanoparticles are investigated and their application in NMR-based assay is demonstrated.

Key words: magnetic nanoparticles, nuclear magnetic resonance, immunoassay

Currently, magnetic nanoparticles are used to develop assays based on the principle of nuclear magnetic resonance (NMR). Magnetic nanoparticles have the ability to influence the relaxation time of nearby protons. Measuring the relaxation time makes it possible to quantify the content of magnetic nanoparticles on the surface of an immunosorbent, which underlies the development of solid-phase test systems.

In the course of work, stable conjugates of iron-carbon nanoparticles (iron core-carbon shell) with recognition molecules: monoclonal antibodies and streptavidin were synthesized. The stability of nanoparticles in aqueous solutions was achieved by coating their surface with various inert proteins: casein, gelatin, albumin, to which recognition molecules were covalently attached. The ability to control the size of the conjugates was demonstrated, and their physicochemical properties were evaluated. The synthesized conjugates were used in direct and sandwich assay of proteins in solid phase NMR assay.

This work was supported by Russian Science Foundation (grant No 17-15-01116).

References:

1. Khramtsov P., Kropaneva M., Byzov I., Minin A., Mysik A., Timganova V., Bochkova M., Uimin M., Zamorina S., Yermakov A., Rayev M., *Conjugation of carbon coated-iron nanoparticles with biomolecules for NMR-based assay// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019. V. 176. P. 256-264.

УДК 602.68:57.083

МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА АНТИБИОТИКА КОЛИСТИНА

Серченя Т.С., Дубовская Л.В., Свиридов О.В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
220141, Минск, ул. академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.2
e-mail: serchenya@tut.by

Для технологий иммуноанализа антибиотика колистина в пищевой продукции получены и охарактеризованы специфические иммунореагенты, синтезирован конъюгат антител к колистину с наночастицами золота и исследованы антигены для иммобилизации на тест-полосках.

Ключевые слова: колистин, поликлональные антитела, наночастицы золота, иммунохроматографический анализ, биотинилированный антиген, авидин

Колистин представляет собой циклический полипептидный антибиотик с молекулярной массой 1155 г/моль, который продуцируется *Bacillus polymyxa* подвидами *Colistinus* и оказывает бактерицидное действие в отношении грамотрицательных микроорганизмов. Он относится к антибиотикам резерва и применяется для лечения инфекционных заболеваний, когда другие лекарственные соединения не эффективны. Колистин является самым известным средством против туберкулеза вследствие его активности в отношении синегнойной палочки, устойчивой ко многим лекарственным препаратам. Антибиотик нормируется в странах ЕС и Японии и решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13.02.2018 внесен в перечень ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), содержание которых регламентируется в пищевой продукции.

В работе получены поликлональные антитела к колистину, синтезирован конъюгат антител с наночастицами золота и изучены твердофазные антигены на основе колистина для иммобилизации на тест-полосках. Для получения антител проводили иммунизацию животных с применением в качестве иммуногена конъюгата колистина с рекомбинантным лактоферрином, синтезированного путем ацилирования янтарным ангидридом аминокислотных групп белка и реакции образовавшихся карбоксильных групп с аминокислотными группами антибиотика в присутствии водорастворимого карбодиимида. По спектрам MALDI-TOF рассчитано, что в иммуногене содержится 14 остатков колистина на 1 молекулу белка-носителя. Полученные антитела к колистину характеризовались титром 1:50 000-1:80 000 и отсутствием перекрестной реакции с другими антибиотиками. Наночастицы золота получали по методу Френса и конъюгировали с антителами к колистину с использованием раствора цельной специфической антисыворотки, титр которой для взаимодействия определяли по флокуляционной кривой [1]. Иммунохимические свойства полученного конъюгата исследовали в конструкциях иммунохроматографического анализа (ИХА). На нитроцеллюлозную мембрану (комплект мембран MDI, Индия) наносили твердофазные антигены в аналитической зоне и антивидовые антитела в контрольной зоне. Исследованы три конструкции, различающиеся по структуре иммобилизованных антигенов. В первом случае иммобилизовали конъюгат колистина с лактоферрином. Во второй конструкции на мембрану наносили комплекс авидина и биотинилированного колистина. В третьей конструкции адсорбировали авидин, а биотинилированный колистин находился в жидкой фазе системы. ИХА проводили путем погружения тест-полоски в раствор антител, меченных коллоидным золотом, и инкубации в течение 10 мин. Установлено, что полученный конъюгат антител с наночастицами золота взаимодействует с антивидовыми антителами в контрольной зоне тест-полосок и твердофазными антигенами в аналитической зоне. Показано, что наиболее интенсивное связывание происходит в случае иммобилизации конъюгата колистина с лактоферрином (46,8 % от общей интенсивности окрашивания) и комплекса авидин-биотинилированный колистин (55,8 %). При использовании конъюгата биотин-колистин в подвижной фазе и иммобилизованного на тест-полоске авидина интенсивность окраски в аналитической зоне была наименьшей по сравнению с другими твердофазными антигенами (23,7 %). Таким образом, полученные и охарактеризованные специфические иммунореагенты и исследованные конструкции могут служить основой разработки тест-системы для ИХА антибиотика колистина в пищевой продукции.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ-РФФИ (проект X18P-060).

Литература:

1. Byzova N.A., Smirnova N.I., Zherdev A.V., Eremin S.A., Shanin I.A., Lei H.-T., Sun Y., Dzantiev B.B. Rapid immunochromatographic assay for ofloxacin in animal original foodstuffs using native antisera labeled by colloidal gold // *Talanta*. 2014. Vol. 119. P. 125-132.

УДК 602.68:57.083

MODEL LATERAL FLOW IMMUNOASSAY SYSTEMS FOR ANTIBIOTIC COLISTIN

Serchenya T.S., Dubovskaya L.V., Sviridov O.V.

Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
5/2 Academician V.F. Kouprevich St., Minsk, 220141, Belarus
e-mail: serchenya@tut.by

To develop the technology of a lateral flow immunoassay for antibiotic colistin in foods of animal origin, specific immunoreagents have been obtained and characterized, the conjugate of anti-colistin antibodies with gold nanoparticles has been synthesized and antigens for immobilization on test strips have been studied.

Key words: colistin, polyclonal antibodies, gold nanoparticles, lateral flow immunoassay, biotinylated antigen, avidin

Colistin is a cyclic polypeptide antibiotic that is produced by *Bacillus polymyxa* and acts against gram-negative microorganisms. It belongs to the reserve antibiotics and considered as the last-line treatment for the emergence of multidrug-resistant gram-negative bacteria infections. Colistin has been widely used as a feed additive for its significant growth-promoting effect in livestock. The food level of this antibiotic is standardized in the EU countries and Japan. By the decision of the Board of the Eurasian Economic Commission dated February 13, 2018, colistin was included in the list of veterinary medicinal products (pharmacologically active substances), the content of which is regulated in food products.

We have obtained polyclonal antibodies against antibiotic colistin and conjugated the anti-colistin antibodies with gold nanoparticles. Also several antigens for immobilization on test strips have been studied. The polyclonal antibodies to colistin were generated in rabbits using the conjugate of colistin and recombinant human lactoferrin. This immunogen was synthesized by acylation of the protein amino groups with succinic anhydride followed by the reaction of the formed carboxyl groups with the amino groups of the antibiotic in the presence of a water-soluble carbodiimide. According to the MALDI-TOF spectra, the immunogen contains 14 residues of colistin per 1 molecule of the carrier protein. The obtained antibodies has a working titer in the range of 1:50 000 to 1:80 000 and shows no cross-reaction with other peptide antibiotics. Gold nanoparticles were obtained according to the method of Frens and further conjugated with anti-colistin antibodies using the whole antiserum with the titer determined by the flocculation curve [1]. The immunochemical properties of the conjugate were studied by a lateral flow immunoassay. The coating antigens in the analytical zone and anti-rabbit antibodies in the control zone were applied to the nitrocellulose membrane (kit of membranes Mdi, India). Three constructions of test-system were investigated. In the first case, the colistin-lactoferrin conjugate was immobilized. In the second construction, the analytical zone was formed using a complex of avidin and biotinylated colistin. In the third construction, avidin was immobilized, and biotinylated colistin was used in the liquid phase. The lateral flow immunoassay was performed by immersing the test strip in a solution of the labeled antibodies and incubating for 10 min. It has been established that the conjugated antibody interacts with anti-rabbit antibodies in the control zone of test strips and binds to solid-phase antigens in the analytical zone. The most binding occurred when colistin-lactoferrin conjugate (46.8% of total color intensity) and avidin - biotinylated colistin complex (55.8%) were immobilized. The coloration of the analytical zone in the third construction was lower compared to other antigens (23.7%). Thus, the obtained and characterized specific immunoreagents and studied test-system constructions can serve as the basis for the development of a lateral flow immunoassay for determination of the antibiotic colistin in food products.

This work was supported by BRFFR-RFFI (project X18R-060).

References:

1. Byzova N.A., Smirnova N.I., Zherdev A.V., Eremin S.A., Shanin I.A., Lei H.-T., Sun Y., Dzantiev B.B. Rapid immunochromatographic assay for ofloxacin in animal original foodstuffs using native antisera labeled by colloidal gold // *Talanta*. 2014. Vol. 119. P. 125-132

НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И АМФИФИЛЬНЫХ ДИБЛОКСОПОЛИМЕРОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОСЕНСОРНЫХ ПОКРЫТИЙ

А.Ю.Коняхина

Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, Россия, 117587, Москва, Кировоградская, 8к1
e-mail: konyakhina@list.ru

Получены универсальные, удобные в обращении и обладающие высокой коллоидной устойчивостью дисперсии углеродных нанотрубок в водных растворах амфифильных ионогенных полимеров. Показано, что модификация планарных графитовых электродов такими дисперсиями позволяет многократно увеличить электрохимические отклики анализируемых биомолекул.

Ключевые слова: электроанализ, углеродные наноматериалы, амфифильные полимеры

Модификация электродов нанокompозитными покрытиями, содержащими углеродные наноматериалы (одно- и многостенные углеродные нанотрубки, графен, оксид графена и проч.), широко применяется при конструировании высокочувствительных электрохимических сенсорных устройств. Степень и качество интеграции углеродного наноматериала в нанокompозитном покрытии определяет качество, чувствительность и, в конечном итоге, рыночную конкурентоспособность биоаналитического устройства. Однако эти материалы, в общем, являются трудно диспергируемыми (в особенности в водных средах), что вызывает значительные трудности и ограничивает их практическое использование для модификации электродов, [1].

Данная работа посвящена конструированию и исследованию строения нанокompозитных покрытий на основе углеродных нанотрубок и амфифильных ионогенных диблоксополимеров, которые содержат в своем составе одновременно гидрофобный и гидрофильный (ионогенный) блоки. Гидрофобный фрагмент такого диблоксополимера адсорбируется на поверхности частиц углеродного наноматериала, а гидрофильный обеспечивает их диспергирование и высокую коллоидную устойчивость в водных средах, [2]. Общий гидрофильно-гидрофобный баланс, а также суммарный заряд и плотность заряда амфифильного ионогенного диблоксополимера можно регулировать, изменяя соотношение длин гидрофобного и гидрофильного блоков, а также параметры водной среды (например, pH), что позволяет получать углерод-полимерные гибридные материалы с требуемыми свойствами.

В данной работе приведены примеры диспергирования многостенных углеродных нанотрубок в водных растворах как катионных (полибутадиен-блок-полидиметиламиноэтилметакрилат), так и анионных (поли-н-бутилметакрилат-блок-полиакриловая кислота) амфифильных диблоксополимеров, а также рассмотрены перспективы применения полученных нанокompозитных углерод-полимерных сенсорных покрытий на планарных графитовых электродах для прямого количественного электрохимического анализа биомолекул (цитохрома с, ДНК).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-44-04011).

Литература:

1. Junrong Yu, Nadia Grossiord, Cor E. Koning, Joachim Loos. Controlling the dispersion of multi-wall carbon nanotubes in aqueous surfactant solution//Carbon. 2007. Vol. 45. P. 618-623.
2. Soheila Javadian, Ali Motaei, Maryam Sharif, Hasti Aghdastinat, Fariba Taghavi. Dispersion stability of multi-walled carbon nanotubes in cationic surfactant mixtures//Colloids and Surfaces A. 2017. Vol. 531. P. 141-149.

NANOCOMPOSITES BASED ON CARBON NANOTUBES AND AMPHIPHILIC DIBLOCK COPOLYMERS: PREPARATION AND PROSPECTS OF APPLICATION AS BIOSENSOR COATINGS

A.Konyakhina

M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, 117587, Moscow, Kirovogradskaya, 8/1
e-mail: konyakhina@list.ru

Universal, easy-to-handle and highly colloidally-stable dispersions of carbon nanotubes in aqueous solutions of amphiphilic ionic polymers are prepared. Modification of planar graphite electrodes by such dispersions results in a manifold increase of electrochemical responses of analyzed biomolecules.

Key words: electroanalysis, carbon nanomaterials, amphiphilic polymers

Modification of electrodes by nanocomposite coatings containing carbon nanomaterials (single- and multi-walled carbon nanotubes, graphene, graphene oxide, etc.) is widely applied for construction of highly-sensitive electrochemical sensor setups. Level and quality of integration of the carbon nanomaterial in the nanocomposite coating determines quality, sensitivity, and ultimately market competitiveness of a bioanalytical device. However, such materials are in general hardly dispersible (especially in aqueous media) that brings considerable challenges and limits their application for modification of the electrodes, [1].

This work aims at preparation and characterization of the nanocomposite coatings based on the carbon nanotubes and amphiphilic ionic diblock copolymers containing both hydrophobic and hydrophilic (ionic) blocks. A hydrophobic segment of the diblock copolymer adsorbs onto surface of carbon nanomaterial particles while a hydrophilic one provides their dispersing and high colloidal stability in aqueous media, [2]. The overall hydrophilic-hydrophobic balance as well as the total charge and charge density of the amphiphilic ionic diblock copolymer can be varied by changing lengths of the hydrophobic and hydrophilic blocks as well as aqueous medium conditions (for example, pH) that allows preparation of carbon-polymer hybrid materials with desired properties.

In this contribution, the examples of dispersing of multi-walled carbon nanotubes in aqueous solutions of both cationic (polybutadiene-block-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)) and anionic (poly(n-butyl acrylate)-block-poly(acrylic acid)) amphiphilic diblock copolymers are reported and the prospects of application of the prepared nanocomposite carbon-polymer sensor coatings on planar graphite electrodes for direct quantitative electrochemical analysis of biomolecules (cytochrome c, DNA) are considered.

This work was financially supported by the Russian Science Foundation (the grant № 18-44-04011).

References:

1. Junrong Yu, Nadia Grossiord, Cor E. Koning, Joachim Loos. Controlling the dispersion of multi-wall carbon nanotubes in aqueous surfactant solution//Carbon. 2007. Vol. 45. P. 618-623.
2. Soheila Javadian, Ali Motaei, Maryam Sharif, Hasti Aghdastinat, Fariba Taghavi. Dispersion stability of multi-walled carbon nanotubes in cationic surfactant mixtures//Colloids and Surfaces A. 2017. Vol. 531. P. 141-149.

УДК 543

НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДА: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ МЕТОК

Горячева И.Ю., Кокорина А.А., Цюпка Д.В., Мордовина Е.А.

Саратовский Государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт Химии, 410012, Саратов, Астраханская, 83
e-mail: goryacheva@yandex.ru

Рассмотрены особенности применения люминесцентных углеродных наноструктур в качестве потенциальных меток. В презентации будут проанализированы свойства и однородность люминесцентных УНЧ с фокусом на биоконъюгацию и применение в качестве метки, связанной с биомолекулой.

Ключевые слова: углеродные наночастицы, люминесцентные метки, иммуноанализ, конъюгирование.

Люминесцентные углеродные наночастицы (УНЧ) привлекают внимание исследователей начиная с 2006 года, когда были впервые описаны их синтез и люминесцентные свойства. Люминесцентные УНЧ рассматриваются в качестве замены традиционных полупроводниковых квантовых точек. Они имеют ряд достоинств, в частности интенсивная люминесценция, большая площадь поверхности с карбоксильными группами, коллоидная стабильность, размеры в области нескольких нанометров, фото- и химическая стабильность, биосовместимость и низкая токсичность. Существует большое количество исходных материалов и способов синтеза УНЧ. Исходные материалы варьируются от стандартизированных химических веществ до натуральных продуктов. УНЧ широко используются для биомедицинской визуализации, в то время как их применение для нацеленного взаимодействия очень ограничено.

В презентации будут проанализированы свойства и однородность люминесцентных УНЧ с фокусом на биоконъюгацию и применение в качестве метки, связанной с биомолекулой.

Работа выполнена при поддержке МОН (проект 4.1063.2017/4.6).

UDC 543

NANOSIZED LUMINESCENT CARBON-BASED MATERIALS: SOME PERSPECTIVES TO USE AS LABELS

Goryacheva I.Y., Kokorina A.A., Tsyupka D.V., Mordovina E.A.

Saratov State University, Chemistry Institute, Russia, 410012, Saratov, Astrakhanskaya, 83
e-mail: goryacheva.i@mail.ru

The features of the potential application as luminescent labels of carbon nanostructures are considered. In the presentation synthesis, properties, uniformity of luminescent CNDs will be analyzed with the focus of bioconjugation and application as a biomolecule-bound label.

Key words: carbon nanoparticles, luminescent labels, immunoassay, conjugation.

Luminescent carbon nanoparticles (CND) have attracted the attention of researchers since 2006, when their synthesis and luminescent properties were first described. Luminescent CNPs can be used as a substitution of traditional semiconductor quantum dots. They have several prospective advantages like bright luminescence, tunable excitation and emission spectra, large surface area with carboxylic groups, high colloidal stability, units of nm size, photo- and chemical stability, biocompatibility and low toxicity. There is a large number of start materials and reported approaches for CND synthesis. Start materials vary from standardized chemical reagents to laboratory-produced chemicals or natural products. CNDs are widely used for biomedical visualization, while their application for targeted interaction is very restricted.

In the presentation synthesis, properties, uniformity of luminescent CNDs will be analyzed with the focus of bioconjugation and application as a biomolecule-bound label.

The work was supported by Russian Ministry of Science and Education, project 4.1063.2017/4.6

УДК 577.11

ОБНАРУЖЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕДЛЕННОЙ ИЗОФОРМЫ СКЕЛЕТНОГО ТРОПОНИНА I В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА

Богомолова А.П.¹, Березникова А.В.²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биохимии, Москва, Россия

²МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоорганической химии, Москва, Россия;
ООО Хайтест, Москва, Россия
119991, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: bogomolova.agnessa@yandex.ru

Была разработана система для количественного определения скелетного тропонина I в крови человека. Показано, что новая система может быть использована для обнаружения повреждений скелетной мускулатуры человека.

Ключевые слова: тропонин I, медленная изоформа скелетного тропонина I, повреждения скелетной мускулатуры, моноклональные антитела, иммунодиагностика

Тропонин I (TnI) вместе с тропонином Т (TnT) и тропонином С (TnC) входит в состав тропонинового комплекса и участвует в регуляции мышечного сокращения. В организме человека TnI представлен тремя изоформами – сердечной (сTnI) и двумя скелетными изоформами – быстрой и медленной (fsTnI, ssTnI). Так как fsTnI и ssTnI в организме человека присутствуют только в скелетной мускулатуре, то было предложено использовать их в качестве высокоспецифичных маркеров повреждения скелетных мышц различ-

ной этиологии – миопатий, рабдомиолиза, вызванного приемом лекарственных препаратов; травм, в том числе и вызванных интенсивной физической нагрузкой.

Целью данной работы было создание прототипа диагностической системы для количественного определения в крови человека медленной скелетной изоформы TnI и измерение ssTnI в крови больных с повреждениями скелетной мускулатуры.

В ходе работы была получена библиотека из 60 мышинных моноклональных антител, специфичных к ssTnI и узнающих различные эпитопы на поверхности белка. Для создания прототипа диагностической системы выбирали антитела, которые распознают не только свободный ssTnI, но и ssTnI в составе комплекса с TnC и TnT. Предпочтение отдавали антителам, распознающим центральный участок ssTnI, который считается наиболее стабильным. Использовали только те антитела, которые не демонстрировали перекрестное взаимодействие ни с fsTnI, ни с cTnI. Антитела тестировали методом флуориметрического анализа типа “сэндвич”, где одно из антител выступало в роли антитела подложки, а другое – в роли детекторного антитела, конъюгированного с хелатом европия (Eu (III) chelate of 2,2',2",2'''-{4-[4-(iodoacetamido)phenylethynyl]pyridine-2,6-diyl}bis(methylenenitrolo)}tetrakis(acetic acid)). В качестве калибратора использовали рекомбинантный ssTnI.

В результате проведенных исследований для создания прототипа диагностической системы была выбрана пара антител ssTnI8 (антитело подложки) – ssTnI4 (детекторное антитело). Чувствительность системы была определена как 0,24 нг/мл.

Для демонстрации способности разработанной диагностической системы узнавать эндогенный ssTnI в крови человека использовали серийные сыворотки больных с травмами опорно-двигательного аппарата. Было показано, что система обладает достаточной чувствительностью, чтобы детектировать ssTnI через 2-3 дня после травмы (перелом шейки бедра, перелом диафиза большеберцовой кости). Также было показано, что у таких больных в постоперационный период концентрация ssTnI существенно повышается и достигает максимума через 20-30 ч. Максимальная концентрация ssTnI, обнаруженная у больного в постоперационный период (эндопротезирование тазобедренного сустава), достигала 45 нг/мл.

Таким образом, нами была разработана система для обнаружения ssTnI в крови человека. Планируется проведение дополнительных исследований для демонстрации возможности использования разработанной системы для обнаружения незначительных повреждений скелетной мускулатуры, связанных либо с повышенными физическими нагрузками, либо с некрозом ткани, вызванным применением лекарственных средств.

UDC 577.11

DETECTION OF SKELETAL MUSCLE INJURY USING THE SLOW ISOFORM OF SKELETAL TROPONIN I AS A MARKER

Bogomolova A.P.¹, Bereznikova A.V.²

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Biochemistry

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Bioorganic chemistry, Moscow, Russia;

Hytest Ltd, Moscow, Russia

119991, Moscow, 1-12 Leninskie Gory

e-mail: bogomolova.agnessa@yandex.ru

A system for quantitative measurement of skeletal troponin I in human blood was developed. It was shown that the novel system could be used to detect skeletal muscle injury in humans.

Key words: troponin I, slow isoform of skeletal troponin I, skeletal muscle injuries, monoclonal antibodies, immunodiagnosics

Troponin I (TnI) together with troponin T (TnT) and troponin C (TnC) is a part of the troponin complex and regulates muscle contraction. In humans TnI is represented by three isoforms – one cardiac (cTnI) and two skeletal isoforms – fast and slow (fsTnI, ssTnI). As fsTnI and ssTnI present only in skeletal muscle, it was suggested to use them as highly specific markers of skeletal muscle injury with different etiology – myopathies, drug-induced rhabdomyolysis; traumas, including those caused by intensive physical exercise.

The aim of the study was to develop a prototype of a diagnostic system for the quantitative detection of the slow skeletal isoform of TnI in human blood and to measure ssTnI in the blood of patients with skeletal muscle injuries.

A library of 60 mice monoclonal antibodies was generated in the course of the study. These antibodies are specific to ssTnI and recognize different epitopes on the surface of the protein. For the prototype of the diagnostic system antibodies which recognized both free ssTnI and ssTnI complexed with TnC and TnT were chosen. Preference was given to antibodies interacting with the central part of ssTnI which is considered to be more stable. Only antibodies which did not demonstrate any cross-reaction with fsTnI and cTnI were selected. Antibodies were tested in a sandwich-type fluoroimmunoassay where one antibody was used as capture antibody and the other as detection antibody, conjugated with europium chelate (Eu (III) chelate of 2,2',2'',2'''-{4-[4-(iodoacetamido)phenylethynyl]pyridine-2,6-diyl}bis(methylenenitrolo)}tetrakis(acetic acid)). Recombinant ssTnI was used as a calibrator.

As a result one pair of antibodies was selected: ssTnI8 (capture antibody) – ssTnI4 (detection antibody). The system's sensitivity was measured as 0,24 ng/ml.

Serial blood sera of patients with locomotive system trauma were used for confirming the ability of this diagnostic system to recognize endogenous ssTnI in human blood. It was demonstrated that the system had enough sensitivity to detect ssTnI 2-3 days after trauma (femoral neck failure, tibial shaft fracture). Also it was shown that ssTnI concentration rose significantly during the postoperative period and reached its maximal value 20-30 hours after the operation. The maximal ssTnI concentration measured in a patient's blood serum during the postoperative period (endoprosthesis hip replacement) was 45 ng/ml.

In conclusion, a system for ssTnI determination in human blood was developed.

The next phase of this study will include additional research for demonstrating the ability of this system to detect slight skeletal muscle injuries caused by intensive physical exercise or drug-induced tissue necrosis.

УДК: 547-386, 577.112.853, 577.112.854, 577.112.083, 535.37

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА С ИОНАМИ ЕВРОПИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ПРЯМОМ ЛАНТАНИДНОМ ИММУНОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Д.А. Семёнов

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141, Минск, ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.2,
e-mail: dsemenov@iboch.by

Разработан подход к получению комплекса рекомбинантного лактоферрина человека с ионами европия, обладающий свойствами интактного белка и флуоресцентной метки. Благодаря данным свойствам комплекс нашел применение в прямом лантанидном иммунофлуориметрическом анализе.

Ключевые слова: рекомбинантный лактоферрин человека, европий, лантанидный иммунофлуориметрический анализ

Многочисленные биомедицинские исследования показали, что лактоферрин (ЛФ) участвует в большом количестве важных физиологических процессов и имеет широкий спектр биологических свойств, вследствие которых он необходим новорожденным и полезен для взрослых. В мировой биотехнологии человеческий ЛФ производится в виде рекомбинантного белка (рчЛФ), продуцируемого в нескольких системах экспрессии, включая трансгенных животных. В Беларуси получено стадо коз, производящих рчЛФ, и разработана методика очистки физиологически активного рчЛФ из молока трансгенных коз в результате работ, поддержанных программами Союзного государства Беларуси и России.

Известно, что гликопротеин ЛФ обладает способностью обратимо связывать два иона железа в трехвалентном состоянии. В этом процессе бикарбонат ион действует как синергетический анион, нейтрализуя положительный заряд в сайте связывания белка. Также сообщалось, что различные другие ионы металлов могут заменить ионы железа, в том числе лантаниды [1]. Ион европия был выбран в качестве комплексообразователя, потому что имеет более высокую интенсивность флуоресценции по сравнению с другими лантанидами.

Целью данной работы являлось изучение специфического связывания ионов европия с рчЛФ, который мог бы использоваться в качестве флуоресцентной метки в прямом конкурентном лантанидном иммунофлуориметрическом анализе.

Высокоочищенный (95-98 %) рчЛФ, с содержанием эндогенного Fe³⁺ около 10 % от насыщения, выделен

из молока трансгенных коз-продуцентов в Институте микробиологии НАН Беларуси [2]. Метод получения комплекса состоял в смешивании растворов рчЛФ и хлорида европия в присутствии нитрилтриуксусной кислоты с последующей очисткой гель-хроматографией. Содержание европия в белке определяли методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме (ICP-MS), а также путем измерения интенсивности флуоресценции Eu^{3+} , связанного белком в растворе 2-нафтоилтрифторацетона и три-*n*-октилфосфиноксида. Степень насыщения белка редкоземельным металлом составила 20-25 %. Определено, что ионы Eu^{3+} высвобождаются из комплекса с белком при pH 3,2 в течение 10 минут как в случае нахождения белка в растворе, так и адсорбированного на твердой фазе.

В модельной системе определены количественные параметры связывания комплекса с поликлональными антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета. Концентрация ЛФ, вызывающая 50%-ное ингибирование связывания метки, оказалась равной 25 нмоль/л, линейаризованный диапазон определения ЛФ составил 4 нмоль/л – 200 нмоль/л.

Найденные в работе условия комплексообразования позволяют легко получать комплекс рекомбинантного лактоферрина человека с ионами европия и применять его при изучении белок-белковых взаимодействий с участием лактоферрина и для определения концентрации лактоферрина в биологических жидкостях методом прямого конкурентного иммуноанализа.

Государственная программа «Наукоемкие технологии и техника» на 2016 – 2020 годы.

Литература:

1. Baker E.N., Anderson B.F., Baker H.M., Haridas M., Norris G.E., Rumball S.V. and Smith C.A. Metal and anion binding sites in lactoferrin and related proteins // *Pure Appl. Chem.* – 1990. – Vol. 62, № 6. – P. 1067-1070.
2. Semenov D.A., Vashkevich I.I., Sviridov O.V. Interactions of recombinant human lactoferrin (rhLF) and natural lactoferrins with anti-rhLF antibodies in a prototype enzyme immunoassay system // *Chemistry, structure and function of biomolecules: proceedings of VI International conference (Minsk, May 22-25, 2018)*. – Minsk, 2018. – P. 161-164.

UDC: 547-386, 577.112.853, 577.112.854, 577.112.083, 535.37

OBTAINING A COMPLEX OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN WITH EUROPIUM IONS AND ITS APPLICATION IN DIRECT LANTHANIDE IMMUNOFLUORESCENCE ANALYSIS

D.A. Semenov

*Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Belarus, 220141, Minsk, Academician V.F. Kouprevich St., 5/2
e-mail: dsemenov@iboch.by*

An approach to obtaining the complex of recombinant human lactoferrin with europium ions was developed. It has the properties of native protein and fluorescent label. Due to these properties the complex has found application in direct lanthanide immunofluorescence analysis.

Key words: recombinant human lactoferrin, europium, lanthanide immunofluorescence analysis

Numerous biomedical studies have shown that lactoferrin (LF) takes part in a large number of important physiological processes and has a wide range of biological activities that are essential for newborns and beneficial for adults. In global biotechnology, human LF is manufactured as a recombinant protein (rhLF) obtained in several expression systems including transgenic animals. In Belarus the herd of goats that produce rhLF was generated and a procedure for the purification of physiologically active rhLF from transgenic goat milk was developed as the result of works supported by Belarus-Russia Union State programs.

The glycoprotein LF is known for its capacity to reversibly bind two iron ions in their trivalent state. In this process, a bicarbonate ion acts as a synergistic anion by neutralizing a positive charge in the binding site of the protein. It has also been reported that various other metal ions can be substituted for iron, including lanthanides [1]. Europium ion was selected as a complexing agent because it has a higher fluorescence intensity than other lanthanides.

The purpose of this work was to study the specific binding of europium ions to rhLF which could be used as a fluorescent label in direct competitive lanthanide immunofluorescence analysis.

High purity (95-98 %) rhLF with an endogenous iron content of about 10 % of saturation was isolated from transgenic goat milk at the Institute of Microbiology of NAS of Belarus [2]. The method of obtaining the complex

consisted in mixing solutions of rhLF and europium (III) chloride in the presence of nitrilotriacetic acid, followed by purification by gel chromatography. The content of europium in protein was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and by measuring the fluorescence intensity of Eu^{3+} bound by rhLF in a solution of 2-naphthoyl trifluoroacetone and tri-n-octylphosphine oxide. The saturation of the protein with rare earth metal is 20-25 %. It was determined that Eu^{3+} ions are released from the complex with the protein at pH 3.2 in 10 minutes, both when the protein is in solution and adsorbed on the solid phase.

In the prototype system, quantitative parameters of the binding of the complex to polyclonal antibodies immobilized in wells of microplate are determined. The concentration of LF, which causes a 50 % inhibition of label binding, is 25 nmol/L, the linear range for determining LF is 4 nmol/L - 200 nmol/L.

It was found the complexation conditions make it easy to obtain the complex of recombinant human lactoferrin with europium ions and apply it when studying protein-protein interactions involving lactoferrin and to determine the concentration of lactoferrin in biological fluids using direct competitive immunoassay.

The state program «High technologies and equipment» for 2016 - 2020 years.

References:

1. Baker E.N., Anderson B.F., Baker H.M., Haridas M., Norris G.E., Rumball S.V. and Smith C.A. Metal and anion binding sites in lactoferrin and related proteins // *Pure Appl. Chem.* – 1990. – Vol. 62, № 6. – P. 1067-1070.
2. Semenov D.A., Vashkevich I.I., Sviridov O.V. Interactions of recombinant human lactoferrin (rhLF) and natural lactoferrins with anti-rhLF antibodies in a prototype enzyme immunoassay system // *Chemistry, structure and function of biomolecules: proceedings of VI International conference (Minsk, May 22-25, 2018).* – Minsk, 2018. – P. 161-164.

УДК 621.039.75

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОПРОВОЛОЧНОГО ДЕТЕКТОРА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКА СА 125

Мальсагова К.А., Плешакова Т.О., Иванов Ю.Д., Попов В.П., Арчаков А.И.

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

Показана возможность использования нанопроволочного детектора для детекции белка СА 125, ассоциированного с развитием онкологических заболеваний, в буферном растворе. Концентрационный предел обнаружения СА 125 с помощью нанопроволочного детектора составил 10-17М.

Ключевые слова: СА 125, рак яичников, антитела, аптамеры, нанопроволока, нанопроволочный детектор

Нанопроволочный детектор (НП детектор) позволяет регистрировать белковые маркеры в буферных растворах при низких концентрациях ($<10^{-15}$ М), а также в биообразцах плазмы крови [1,2]. Анализ проводится в режиме реального времени без использования дополнительных меток. Показано, что с помощью НП детектора в буферном растворе может быть обнаружен белок СА 125. На сегодняшний день СА 125 широко используется в целях скрининга и диагностики онкологических заболеваний и мониторинга успешности проведенной терапии. К причинам повышения уровня СА125 относятся злокачественные образования (рак яичников, рак эндометрия, рак молочной железы, первичный рак печени, рак почки и др.), доброкачественные опухоли и кисты, воспалительные процессы, беременность. Для исследования использовали НП детектор n-типа, содержащий нанопроволоки (сенсорные элементы) шириной 3 мкм. Поверхность сенсорных элементов была функционализирована ковалентно иммобилизованными молекулярными зондами – антителами и аптамерами против белка СА125 – рабочие нанопроволоки. Контрольные нанопроволоки были функционализированы антителами против белка Bcl-2, не имеющими специфического взаимодействия с целевым белком. В кювету НП детектора, содержащую буферный раствор (1 мМ КФБ, pH 7,4) вносили раствор белка СА 125 в концентрационном диапазоне 10^{-14} - 10^{-18} М. В контрольных экспериментах в кювету НП детектора добавляли раствор, не содержащий СА125.

Было получено, что НП детектор позволяет в реальном времени без меток проводить регистрацию белковых молекул в объеме 450 мл с высокой чувствительностью. Так, минимальная концентрация белка СА 125, которую удалось зарегистрировать составила $\sim 10^{-17}$ М в случае использования аптамеров и

$\sim 10^{-16}$ М в случае использования антител в качестве молекулярных зондов. Таким образом, показано, что использование аптамеров в качестве молекул-зондов является перспективным для проведения анализа с использованием НП детектора.

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, 261, p. 566–571.
2. Malsagova K. A. Pleshakova T.O., Galiullin R.A., A.L.Kaysheva, Shumov I.D., Ilitskii M. A., Popov V., P., Glukhov A., V., Archakov A.I., Ivanov Yu. D. Ultrasensitive nanowire-based detection of HCVcoreAg in the serum using a microwave generator. Analytical Methods. 2018, 10(23), p. 2740-2749.

UDC 621.039.75

THE USE OF A NANOWIRE DETECTOR FOR THE REVELATION OF CA 125 PROTEIN

Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Ivanov Yu.D., Popov V.P., Archakov A.I.

Institute of Biomedical Chemistry

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

e-mail: kristina.malsagova86@gmail.com

The use of a nanowire (NW) detector for the detection of CA 125 protein (which is associated with the development of oncological diseases) in buffer solution has been demonstrated. The concentration limit of CA 125 detection with the NWdetector of 10^{-17} M has been attained.

Key words: CA 125, ovarian cancer, antibodies, aptamers, nanowire, nanowire detector

Nanowire detectors (NW detectors) allow one to register protein markers in buffer solutions at low ($<10^{-15}$ M) concentrations, as well as in biological samples (plasma) [1,2]. The analysis is carried out in real time and is label-free. It has been demonstrated that, using a NW biosensor, CA 125 protein can be detected in buffer solution. To date, CA 125 is widely used as marker protein for screening and diagnosis of cancer and for monitoring therapy effectiveness. The causes of increase in CA125 level include malignant tumors (ovarian cancer, endometrial cancer, breast cancer, primary liver cancer, kidney cancer, etc.), benign tumors and cysts, inflammatory processes, and pregnancy. In the present study, a NW detector with 3- μ m-wide n-type sensor elements (nanowires, NWs) has been employed. The surface of working NWs was functionalized with covalently immobilized probe molecules – antibodies and aptamers against CA125 protein. The surface of control NWs was functionalized with antibodies against Bcl-2 protein, which do not interact specifically with the target CA125 protein. The solution of CA 125 protein was added into the measuring cell of the NW detector containing 1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) to the final concentration in the range from 10^{-14} M to 10^{-18} M. In control experiments, a CA 125-free solution was added into the cell.

It has been obtained that the NW detector allows one to perform label-free registration of protein molecules in a 450- μ L volume of solution with high sensitivity in real time. In this way, The lowest detectable concentration of CA 125 protein was $\sim 10^{-17}$ M and $\sim 10^{-16}$ M when using aptamers and antibodies as probe molecules, respectively. Thus, it has been demonstrated that the use of aptamers as probe molecules is promising for use in analysis with a NW detector.

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, 261, p. 566–571.
2. Malsagova K. A. Pleshakova T.O., Galiullin R.A., A.L.Kaysheva, Shumov I.D., Ilitskii M. A., Popov V., P., Glukhov A., V., Archakov A.I., Ivanov Yu. D. Ultrasensitive nanowire-based detection of HCVcoreAg in the serum using a microwave generator. Analytical Methods. 2018, 10(23), p. 2740-2749.

УДК 57.083.3

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ КОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛИКОПРОТЕИНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БЕРЕМЕННОСТЬЮ (PAGS), В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ

Рябкова Н. С.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
199911, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1.
e-mail: n.ryabcova@gmail.com

На основе антител, специфичных к гликопротеинам, ассоциированным с беременностью (PAGs), разработан метод для определения беременности коров на ранних сроках развития плода. Показано, что данные антитела определяют PAGs в крови матери, начиная с 4-й недели после оплодотворения.

Ключевые слова: гликопротеины, ассоциированные с беременностью (Pregnancy-Associated Glycoproteins, PAGs); моноклональные мышинные антитела; беременность коров

Ранняя диагностика состояния беременности у животных после искусственного оплодотворения остается крайне важной для животноводства с экономической точки зрения. У подавляющего числа млекопитающих вырабатывается хорионический гонадотропин, который является надежным маркером состояния беременности. Однако у представителей семейства парнокопытных этот гормон не синтезируется. Показано, что у всех парнокопытных вырабатываются особые белки - гликопротеины, ассоциированные с беременностью (Pregnancy-Associated Glycoproteins, PAGs). На сегодняшний день эти белки представляются в качестве наиболее перспективных ранних маркеров беременности. Таким образом, разработка тест-системы для детекции PAGs в сыворотке, плазме или молоке парнокопытных, является одной из наиболее важных задач современного животноводства.

На сегодняшний день известно 22 представителя белков семейства PAGs. Они синтезируются в особых бинуклеарных клетках трофобласта плаценты, которые формируются на ранних этапах развития плода. Несмотря на то, что первый представитель семейства PAGs был выделен и описан достаточно давно, в 1982 году, функции этих белков остаются не до конца изученными. В ряде исследований *in vitro* было показано, что белки PAGs могут оказывать влияние на клетки иммунной системы. Также было предположено, что они выполняют сигнальную функцию, обеспечивая связь между плодом и организмом матери. Сложность изучения индивидуальных особенностей белков этой группы обусловлена тем, что все представители семейства высоко гомологичны и синтезируются с разной интенсивностью на всем протяжении беременности. До сих пор неизвестно, какие из представителей этой группы начинают экспрессироваться на самых ранних этапах развития плода. Важным требованием к тест-системе, определяющей стельность у коров на ранних стадиях, является отсутствие кросс-реактивности используемых антител к PAGs, остающимся в крови в течение 2-3 месяцев после отела (так называемые «поздние» PAGs). Таким образом, основными требованиями к разрабатываемой тест-системе являются высокая чувствительность и специфичность к отдельным представителям семейства PAGs, которые появляются в крови на самых ранних сроках после успешного оплодотворения и элиминируются из организма через 1-2 месяца после отела.

В данной работе была изучена возможность создания тест-системы на основе моноклональных мышинных антител, обладающих широким спектром специфичности к различным представителям семейства PAGs. Такая система с высокой чувствительностью выявляет наличие белков семейства PAGs в крови коров, начиная с 30-го дня после успешного оплодотворения. Однако эти антитела за счет широкой специфичности также выявляют наличие PAGs, присутствующих в крови матери на сроках до 3-х месяцев после отела. Подобная специфичность антител не позволяет создать надежную тест-систему, которая исключила бы возможность детекции «поздних» PAGs

В дальнейшем планируется провести более детальное исследование белков семейства PAGs с целью выявить белки, появляющиеся в крови животного на ранних стадиях беременности и исчезающие из кровотока матери не позднее одного месяца после отела. Планируется получение моноклональных антител, специфичных только к этим белкам без перекрестного взаимодействия с «поздними» PAGs. На основе таких антител планируется создание тест-системы для ранней диагностики беременности коров.

UDC 57.083.3

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINATION PREGNANCY IN COWS USING PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEINS (PAGS) AS MARKERS

Riabkova N. S.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
199911, Moscow, Leneinskie gori, 1
e-mail: n.ryabcova@gmail.com

On the basis of antibodies specific to pregnancy-associated glycoproteins (PAGs), a method has been developed for determining pregnancy in cows in the early stages of fetal development. These antibodies have been shown to detect PAGs in the mother's blood from the 4th week after fertilization.

Key words: pregnancy-associated glycoproteins (PAGs); monoclonal mouse antibodies; pregnancy cows

Early diagnosis of pregnancy in animals after artificial insemination remains extremely important for animal husbandry from an economic point of view. Most mammals produce human chorionic gonadotropin, which is a reliable marker of pregnancy status. However, this hormone is not synthesized in members of the Artiodactyls. It has been shown that all the Artiodactyls produce special proteins - Pregnancy-Associated Glycoproteins, (PAGs). Today, these proteins appear to be the most promising early markers of pregnancy. Thus, the development of a test system for the detection of PAGs in serum, plasma or milk of the Artiodactyls is one of the most important challenges of modern husbandry.

To date, 22 members of the PAGs family of proteins are known. They are synthesized in specific binuclear trophoblast cells of the placenta, which are formed in the early stages of gestation. Despite the fact that the first member of the PAGs family was isolated and described quite a long time ago, in 1982, the functions of these proteins are not fully understood. A number of in vitro studies have shown that PAGs proteins can affect the cells of the immune system. It was also suggested that they perform a signaling function, providing a link between the fetus and the mother's body. The difficulty of studying the individual characteristics of proteins of this group is due to the fact that all members of the family are highly homologous and have different intensity of synthesis throughout pregnancy. It is still unknown which members of this group are expressed at the earliest stages of gestation. An important requirement for a test system that determines pregnancy in cows in the early stages is the absence of cross-reactivity against PAGs remaining in the blood for 2-3 months after calving (the so-called "late" PAGs). Thus, the main requirements for the developed test system are high sensitivity and specificity to the individual members of the PAGs family, which appear in the blood at the earliest periods after successful fertilization and are eliminated from the body 1-2 months after calving.

In this study, we developed a test system based on monoclonal mouse antibodies with a wide range of specificity for various members of the PAG family. This system detects with high sensitivity the presence of members of the PAG family in the cows' blood, starting from the 30th day after successful fertilization. At the same time, it was shown that these antibodies, due to their broad specificity, also reveal the presence of PAGs present in the mother's blood for periods up to 3 months after calving. Such specificity of antibodies does not allow to create a reliable test system that would exclude the possibility of detection of "late" PAGs.

In the future, we plan to conduct a more detailed study of the members of the PAG family in order to identify proteins that appear in the animal's blood in the early stages of pregnancy and disappear from the mother's bloodstream no later than one month after calving. It is planned to obtain monoclonal antibodies specific only to these proteins (without cross-interaction with "late" PAGs). On the basis of such antibodies, we plan to create a test system for the early diagnosis of pregnancy in cows.

УДК 543

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИФА С ПРИМЕНЕНИЕМ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И С ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

Еремин С.А.¹, Пантелеева А.В.¹, Шанин И.А.¹, Кострикина Е.С.², Лебедин Ю.С.²

¹Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, 1
e-mail: eremin_sergei@hotmail.com

²ООО «ХЕМА», 105264, Москва, 9-я Парковая ул., 48

Рассмотрены последние достижения по разработке и применению иммуноферментного анализа (ИФА) для простого и быстрого определения микотоксинов в пищевых продуктах.

Ключевые слова: микотоксины, иммуноферментный анализ

В настоящее время все больше внимания уделяется контролю качества продуктов питания. Одним из наиболее важных аспектов продуктовой безопасности является контроль зараженности зерновых культур и комбикормов микотоксинами, для которых установлены максимально допустимые уровни (МДУ), порядка мкг/кг (или нг/мл). Концентрация микотоксинов может быть определена методом конкурентного ИммуноФерментного Анализа (ИФА). ИФА – простой, быстрый и высокопроизводительный метод, однако не всегда достаточно чувствительный. Существенно повысить чувствительность можно с использованием хемилюминесцентной детекции ферментной метки. На примере наборов ИФА для определения микотоксинов компании ООО «ХЕМА», показана возможность использования хемилюминесцентного детектирования с использованием прозрачных полистироловых планшетов. Показано, что за счет уменьшения концентрации ферментного конъюгата и при оптимизации условий хемилюминесцентной детекции с усиливающими добавками удастся на порядок улучшить аналитические характеристики методик ИФА. Еще одним способом повышения чувствительности методик ИФА является применение в качестве твердой фазы магнитных частиц с иммобилизованными антителами. Произведена сборка экспериментального образца автоматического анализатора для проведения ИФА на магнитных частицах и хемилюминесцентной детекции. Работоспособность аппарата протестирована на стандартных и реальных образцах зерна, загрязненных зеараленом, дезоксиниваленолом, афлатоксином В1 и охратоксином А. Пределы обнаружения составили 15, 180, 7.5 и 10 мкг/кг соответственно.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60717X0185).

УДК 543

DEVELOPMENT OF ELISA WITH THE APPLICATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND CHEMILUMINESCENT DETECTION

Eremin S.A.¹, Panteleeva A.V.¹, Shanin I.A.¹, Kostrikina E.S.², Lebedin Yu.S.²

¹M.V. Lomonosov Moscow State University
Leninskie gory 1, 119991 Moscow, Russia
e-mail: eremin_sergei@hotmail.com

²XEMA Company Limited, Ninth Parkovaya street 48, 105264 Moscow, Russia

The latest advances in the development and application of enzyme immunoassay (ELISA) for the simple and rapid determination of mycotoxins in food are considered.

Key words: mycotoxins, enzyme immunoassay

Currently, more and more attention is paid to food quality control. One of the most important aspects of food safety is the control of contamination of grain crops and mixed feeds with mycotoxins, for which maximum permissible levels (MRLs) are established, of the order of $\mu\text{g} / \text{kg}$ (or ng / ml). The concentration of mycotoxins can be determined by competitive Immuno-Enzyme Assay (ELISA). ELISA is a simple, fast and high-performance

method, but it is not always sensitive enough. Significantly increase the sensitivity can be using chemiluminescent detection of the enzyme label. On the example of ELISA kits for the determination of mycotoxins of the company "XEMA", the possibility of using chemiluminescent detection using transparent polystyrene plates is shown. It has been shown that by reducing the concentration of the enzyme conjugate and optimizing the conditions of chemiluminescent detection with reinforcing additives, it is possible to improve the analytical characteristics of ELISA techniques by an order of magnitude. Another way to increase the sensitivity of ELISA methods is to use magnetic particles with immobilized antibodies as a solid phase. An experimental sample of an automatic analyzer was assembled for carrying out an ELISA on magnetic particles and chemiluminescent detection. The efficiency of the device was tested on standard and real samples of grain contaminated with zearalenone, deoxynivalenol, aflatoxin B1 and ochratoxin A. The detection limits were 15, 180, 7.5 and 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$, respectively.

The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (unique project identifier RFMEFI60717X0185).

UDC 543

РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ДАВЛЕНИЯ ДЛЯ УСТРОЙСТВ ТИПА "ЛАБОРАТОРИЯ-НА-ЧИПЕ"

Ечеистов В.В.¹, Зверев А.В.^{1,2}, Родионов И.А.^{1,2}, Макаrchук В.В.¹, Рыжков В.В.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана (национальный исследовательский университет)», Москва, Россия
105082, Москва, Рубцовская набережная, 2/18

²ФГУП «ВНИИА», Москва, Россия
127055, Москва, ул. Суцеская, д. 22
e-mail: wecheistov@bmstu.ru

Разработана универсальная система поддержания давления с точностью не хуже ± 1 мбар. Разработанная система предназначена для прецизионной подачи реагентов в устройства типа «лаборатория-на-чипе», применяемых для проведения многостадийных биохимических анализов.

Ключевые слова: микрофлюидика, лаборатория-на-чипе, микрофлюидный чип, система поддержания давления

Микрофлюидные технологии получили широкое распространение в биологических и медицинских исследованиях, поскольку позволяют проводить уникальные эксперименты в сверхмалых реакционных объемах, вплоть до операций с одиночными клетками [1]. Развитие микрофлюидных технологий позволило создать принципиально новый класс устройств типа «лаборатория-на-чипе», нацеленных на осуществление многостадийных биохимических реакций в рамках одиночного микрофлюидного чипа. Подобные устройства призваны повысить экономичность, производительность, технологичность и компактность существующих биомедицинских аналитических систем. Лаборатория-на-чипе представляет собой миниатюрный микрофлюидный чип с системой взаимосвязанных микро- или наноразмерных каналов, связывающих функциональные блоки смешения, разведения, детектирования и т.д. [2]. Для подачи реагентов в лабораторию-на-чипе используется принцип вытеснения жидкости избыточным давлением воздуха из герметичного резервуара, сообщающегося с лабораторией-на-чипе. В рамках работы спроектирована система поддержания давления, состоящая из пневматического и электронного модулей. С помощью электронного модуля осуществляется контроль избыточного давления, создаваемого пневматическим модулем. Для спроектированной системы разработан высокопроизводительный алгоритм управления, благодаря которому достигнуты характеристики, обеспечивающие стабильную работу лаборатории-на-чипе:

- точность поддержания давления: не хуже $+0,79/-0,74$ мбар;
- диапазон давлений: 0...500 мбар;
- время реакции системы при изменении давления от 0 до 500 мбар (объем ресивера 50 cm^3): не более 4,78 с.

Работа выполнена с использованием материально-технической базы ЦКП Научно-образовательного центра «Функциональные Микро/Наносистемы» МГТУ им. Н.Э. Баумана (ID 74300)

Литература:

1. Евстапов А.А. Микрофлюидные технологии в биологических и медицинских исследованиях // IX Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2017, 20-22 февраля, Т.2, с.342-343.
2. Abgrall P. and Gué A-M. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem – a review // J. Micromech. Microeng. 2007. Vol. 17. № 15. P. 15-49.

УДК 681.533.36

DEVELOPMENT OF UNIVERSAL PRESSURE CONTROL SYSTEM FOR LAB-ON-CHIP DEVICES

Echeistov V.V.¹, Zverev A.V.^{1,2}, Rodionov I.A.^{1,2}, Makarchuck V.V.², Ryzhkov V.V.^{1,2}

¹Bauman Moscow State Technical University
Rubtsovskaya Naberezhnaya 2/18, 105082 Moscow, Russia
²VNIIA, Sushevskaya st. 22, 127055 Moscow, Russia
e-mail: wecheistov@bmstu.ru

A universal pressure control system with accuracy of ± 1 mbar has been developed. The developed system is designed for precision feed of reagents in a lab-on-a-chip device used for multi-stage biochemical analyzes.

Key words: microfluidics, lab-on-chip, microfluidic chip, pressure control system

Microfluidic technologies are widely used in biological and medical research, because of the possibility to carry out unique experiments in ultralow reaction volumes up to single cell operations [1]. Microfluidic technologies development has made it possible to create a fundamentally new class of Lab-on-a-Chip (LoC) devices aimed at implementing multistage biochemical reactions within a single microfluidic chip. Such devices are designed to improve the efficiency, productivity, technological effectiveness and compactness of existing biomedical analytical systems. LoC represents miniature microfluidic chip with a system of interconnected microscale or nanoscale channels linking functional units for mixing, dilution, detection functional and etc. [2]. For supplying reactants to the lab-on-a-chip is used pressure control system. The pressure control system consisting of pneumatic and electronic modules was designed in this work. The overpressure created by the pneumatic module is monitored with electronic module. For the designed system was developed a high-performance control algorithm, which allowed obtaining required properties, that ensure stability of the LoC operation:

- accuracy of pressure control: better than $+0.79 / -0.74$ mbar;
- pressure range: 0...500;
- system response time when the pressure changes from 0 to 500 mbar (volume of receiver 50 cm³): smaller than 4.78 s.

The work was performed using the material and technical base of the Scientific-Educational Center "Functional Micro / Nanosystems" of the Bauman Moscow State Technical University (ID 74300).

References:

1. Evstapov A.A. Microfluidic technologies in biological and medical research // IX International Congress "Biotechnology: state and development prospects", Moscow, 2017, February 20-22., V.2, pp.342-343.
2. Abgrall P. and Gué A-M. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem – a review // J. Micromech. Microeng. 2007. Vol. 17. № 15. P. 15-49.

УДК 57.083.3

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ЯМР-АНАЛИЗ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРОСТАТСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА

Кропанева М.Д., Храмов П.В., Бызов И.В., Минин А.С., Мысик А.А., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Уймин М.А., Заморина С.А., Ермаков А.Е., Раев М.Б.

Лаборатория экологической иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»,
г. Пермь, Россия, 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, к. 15
e-mail: kropanevamasha@gmail.com

Разработан твердофазный ЯМР-анализ для детекции простатспецифического антигена.

Ключевые слова: ЯМР-анализ, магнитные наночастицы, простатспецифический антиген

В настоящее время в иммунодиагностике существует потребность создания диагностических тест-систем с высокой чувствительностью. Один из подходов к повышению чувствительности — это использование ядерной магнитной резонансной релаксометрии. Суть анализов, использующих данный метод заключается в регистрации изменения времени релаксации протонов T2 в зависимости от наличия в среде магнитных наночастиц (МНЧ). Применительно к нашей работе данный принцип осуществляется следующим образом. Тест-система представлена в формате твердофазного сэндвич-анализа. При связывании магнитных наночастиц с мишенью они задерживаются на поверхности твердой фазы и время релаксации протонов T2 снижается. Таким образом, чем больше молекул анализата находится в пробе, тем больше магнитных наночастиц задерживается на поверхности твердой фазы и тем меньше будет время T2.

Цель данной работы: оптимизация твердофазного ЯМР-сэндвич-анализа на основе магнитных наночастиц для детекции простатспецифического антигена (ПСА).

В работе использовали конъюгаты аминированных железоуглеродных наночастиц с моноклональными антителами (клон 1A6) против ПСА. Принцип твердофазного ЯМР-анализа представлен на рисунке 1.

Впервые показана возможность использования ЯМР-релаксометрии в твердофазном иммуноанализе. Представлены результаты оптимизации проведения твердофазного ЯМР-анализа. Разработанный метод диагностики обладает высокой чувствительностью. Рассмотрены варианты использования конъюгатов магнитных наночастиц с другими распознающими молекулами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-15-01116): разработка и оптимизация анализа; а также частично в рамках государственного задания (№ госрегистрации темы: 01201353246): оценка стабильности диагностических реагентов.

Принцип анализа

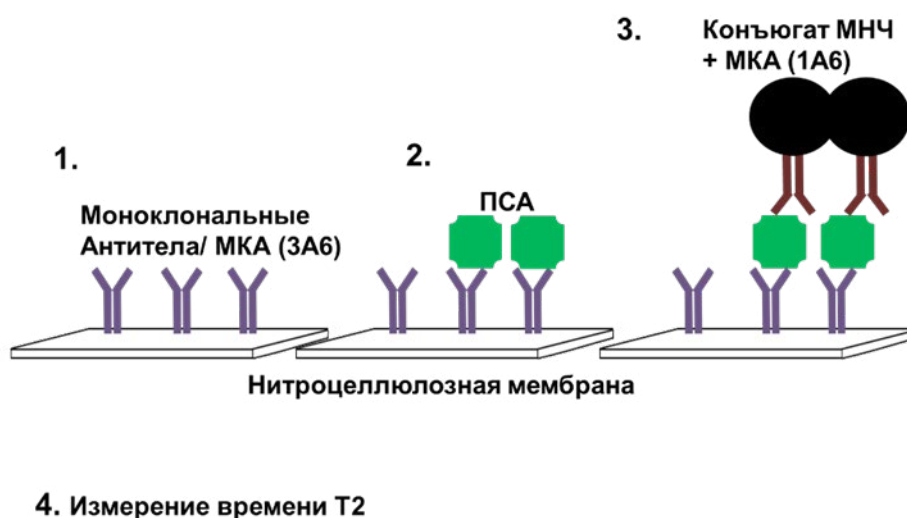


Рис. 1. Принцип твердофазного ЯМР-сэндвич-анализа

Литература:

1. Alcantara D., Lopez S., García-Martin M. L., Pozo D. Iron oxide nanoparticles as magnetic relaxation switching (MRSw) sensors: Current applications in nanomedicine // *Nanomedicine: NBM*. 2016. Vol. 12. №5. P.1253-1262.

UDK 57.083.3

SOLID-PHASE NMR-BASED ASSAY FOR PROSTATSPECIFIC ANTIGEN DETECTION

Kropaneva M.D., Khramtsov P.V., Byzov I.V., Minin A.S., Mysik A.A., Bochkova M.S., Timganova V.P., Uimin M.A., Zamorina S.A., Yermakov A.E., Rayev M.B.

Laboratory of ecological immunology, «Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms», Perm, Russia
614081, 13, Goleva str., Perm
e-mail: kropanevamasha@gmail.com

Solid-phase NMR-based assay for the prostate-specific antigen detection has been developed.

Key words: NMR-based assay, magnetic nanoparticles, prostate-specific antigen

Currently, immunodiagnosics requires high sensitivity diagnostic test systems. One approach of increasing sensitivity is to use nuclear magnetic resonance relaxometry. The essence of assays based on this method is to register the T2 proton relaxation time change depending on the presence of magnetic nanoparticles (MNP) in the medium. Applied to our work, this principle is as follows. The test system is developed in the format of solid-phase sandwich assay. When magnetic nanoparticles bind to a target, they remain on the solid phase surface and the T2 time decreases. Thus, the more analyte molecules are in the sample, the more magnetic nanoparticles stay on the solid phase surface and the less T2 time will be.

The purpose of this work: optimization of solid-phase NMR-based sandwich assay based on magnetic nanoparticles for the detection of prostate-specific antigen (PSA).

Conjugates of aminated iron carbon nanoparticles with monoclonal antibodies (clone 1A6) against PSA were used in the work. The principle of the solid-phase NMR-based assay is shown at Figure 1.

For the first time the possibility of using NMR relaxometry in solid phase immunoassay is shown. The results of optimization of solid-phase NMR analysis are presented. The developed diagnostic method is highly sensitive. The using of conjugates of magnetic nanoparticles with other recognition molecules is considered.

This work was supported by Russian Science Foundation (project No 17-15-01116): development and optimization of assay; and in part the work was done within state task (No state registration of the topic: 01201353246): assessment of the stability of diagnostic reagents.

Assay principle

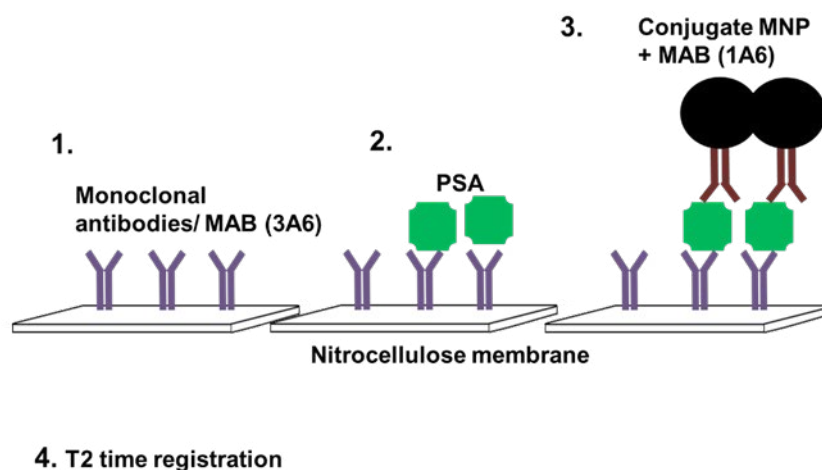


Fig. 1. The principle of solid-phase NMR-based sandwich assay

References:

1. Alcantara D., Lopez S., García-Martin M. L., Pozo D. Iron oxide nanoparticles as magnetic relaxation switching (MRSw) sensors: Current applications in nanomedicine // *Nanomedicine: NBM*. 2016. Vol. 12. №5. P.1253-1262.

УДК 57.088

ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ОБНАРУЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

Яминский И.В.

МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1
e-mail: yaminsky@genebee.msu.ru

Биосенсоры, построенные по принципу электромеханических весов, позволяют обнаруживать биологические агенты с предельно высокой чувствительностью – на уровне единичных вирусов и бактерий. В докладе представлены последние достижения в области электромеханических биосенсоров в решении задач молекулярной диагностики в клинических исследованиях.

Ключевые слова: биосенсор, сканирующий зондовый микроскоп, вирус гриппа, белковые макромолекулы, альбумин, бактерии, пьезокерамика, механический резонанс

В настоящей работе для обнаружения вирусов, белковых макромолекул были применены микроэлектромеханические системы на основе кантилеверов, пьезокерамических и кварцевых микрорезонаторов. Их преимущество – высокая чувствительность, маленькие размеры, возможность проведения анализа без использования дополнительных меток. В основе разрабатываемого биосенсора лежат методы сканирующей зондовой микроскопии, технологии сенсоров на основе микрокантилеверных датчиков, методы электрохимической детекции биообъектов.

Использование герметичной проточной жидкостной ячейки позволяет проводить измерения безопасным для обслуживающего персонала способом и с чувствительностью на уровне единиц – сотен патогенов в мл. В качестве социально значимых мишеней выбраны частицы вируса гриппа, микроальбумин и бактерии кишечной палочки.

Разрабатываемый биосенсор имеет ряд инновационных особенностей:

- 1) Оригинальная конструкция проточной ячейки дает реализовать универсальный способ закрепления биообъектов на подложке за счет гидродинамического потока, сохраняя функциональные свойства биообъектов.
- 2) Биосенсор позволяет без использования дополнительных меток подтверждать наличие в исследуемом образце белков, вирусов и бактерий при их сверхнизкой концентрации, а также определять их количество.
- 3) Регенерация сенсорного слоя возможна за счет химического или механического удаления связавшихся мишеней

Отрасль производства наноаналитического оборудования, и в частности сканирующих зондовых микроскопов, развивается уже более 20 лет. Методы СЗМ позволяют достичь беспрецедентного пространственного разрешения – вплоть до 1 ангстрема, а также получать уникальные данные о локальных физико-механических свойствах исследуемых объектов. Это уникальное свойство особенно актуально при изучении биообъектов в жидких средах максимально приближенных к естественным условиям.

Актуальность работы обусловлена необходимостью создания биосенсора для медицинских приложений со следующими техническими и эксплуатационными параметрами: предельно высокая чувствительность на уровне единичных белков, вирусов и бактерий, наличие полностью автоматической системы регистрации сигнала и встроенного канала передачи данных по открытым каналам, использование прямого метода регистрации мишеней без использования маркеров, меток и химических реагентов, компактность и мобильность устройства, низкая себестоимость, эргономичность, надежность, большой срок службы, удобство в эксплуатации.

Научная новизна состоит в следующем:

- использовании в биосенсоре симметричной геометрической конструкции электродов и сенсорных слоев с соблюдением симметричности электрической схемы измерений. При этом внешние сенсорные электроды могут находиться под заранее выбранном потенциалом, что позволяет оптимальным образом контролировать электрохимические процессы на их поверхности;
- структуре сенсорных слоев с высоко избирательными свойствами по отношению к выбранной мишени;
- разработке оригинальной схемы регистрации полезного сигнала в полностью автоматизированном

режиме и передачи данных на конечное устройство – компьютер, мобильный телефон, сервер;

- построении системы регистрации мишеней без использования химических реагентов;
- реализации регенерации сенсорных слоев без использования химических реагентов за счет механического вибрационного воздействия;
- дополнительной возможности прямого совмещения данной конструкции биосенсора с электрохимическими, колориметрическими и оптическими схемами регистрации сигнала.

UDK 57.088

PHYSICAL PRINCIPLES OF BIOLOGICAL AGENTS DETECTION USING ELECTROMECHANICAL BIOSENSORS

Yaminsky I.V.

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie Gori, 1
e-mail: yaminsky@genebee.msu.ru*

Biosensors built on the principle of electromechanical balances allow the detection of biological agents with extremely high sensitivity - at the level of single viruses and bacteria. The report presents the latest achievements in the field of electromechanical biosensors in solving problems of molecular diagnostics in clinical studies.

Key words: biosensor, scanning probe microscope, influenza virus, protein macromolecules, bacteria, albumin, piezoceramics, mechanical

In the present work microelectromechanical systems based on cantilevers, piezoceramic and quartz microcavities are proposed for the detection of viruses, protein macromolecules. Their advantage is high sensitivity, small size, the possibility of analyzing without using additional labels. The developed biosensor is based on the methods of scanning probe microscopy, microcantilever sensors, electrochemical detection of bioobjects.

The use of a sealed fluid flow cell allows safe measurements for the attendants and with a sensitivity of one unit, hundreds of pathogens per ml. The influenza virus particles, microalbumin, and Escherichia coli bacteria were chosen as the socially significant targets.

The developed biosensor has a number of innovative features:

- 1) The original design of the flow cell provides a universal way of fixing bioobjects on the substrate due to the hydrodynamic flow, while preserving the functional properties of bioobjects.
- 2) The biosensor allows us to confirm the presence of ultralow concentration of proteins, viruses and bacteria in the sample, and also to determine their number without using additional labels.
- 3) Regeneration of the sensory layer is possible due to chemical or mechanical removal of bound targets

The production of nanotechnology equipment, and in particular scanning probe microscopes, has been developing for more than 20 years. SPM methods make it possible to achieve unprecedented spatial resolution - up to 1 angstrom, and to obtain unique data on local physical and mechanical properties of the objects under study. This unique property is especially important when studying bioobjects in liquid media as close as possible to natural conditions.

The urgency of the present study is to create a biosensor for medical applications with the following technical and operational parameters: extremely high sensitivity at the level of single proteins and viruses, the presence of a fully automatic signal recording system and built-in data channel over open channels, the use of a direct method for registering targets without using markers, labels and chemical reagents, compactness and mobility of the device, low cost, ergonomics, reliability, long service life, ease of use.

Scientific novelty of the project consists in:

- symmetrical geometric construction of electrodes and sensor layers with the observance of the symmetry of the electrical measurement circuit. In this case, external sensor electrodes can be located at a preselected potential, which allows to control electrochemical processes on their surface in the optimal way;
- sensory layers with highly selective properties to the chosen target;
- the development of an original scheme registering a useful signal in a fully automated mode and transferring data to the final device - a computer, a mobile phone, a server;
- the construction of a target registration system without chemical reagents;
- regeneration of sensory layers without chemical reagents due to mechanical vibration;

– an additional possibility of directly combining this design of the biosensor with electrochemical, colorimetric and optical signal registration circuits.

УДК 621.015.1

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ ДНК КАК ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Шумянцева В.В.^{1,2}, Булко Т.В.¹, Пергушов Д.В.², Сиголаева Л.В.^{1,2}

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича, Россия, 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10

²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия, 119991, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1/3

e-mail: Viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Разработан метод анализа нуклеотидов, олигонуклеотидов и ДНК с помощью электродов, модифицированных стабильными дисперсиями углеродных нанотрубок в полимерных композициях катионных полимеров и диблок-сополимеров.

Ключевые слова: электроанализ, ДНК, углеродные наноматериалы, электроокисление, лекарственные препараты

Нуклеотиды, олигонуклеотиды, ДНК, РНК являются маркерами многочисленных патологических состояний. Методы электроанализа гетероциклических оснований, нуклеотидов, ДНК и РНК основаны на способности пуринов (при положительных значениях потенциалов) и пиримидинов (при высоких положительных значениях потенциалов) окисляться по pH-зависимому механизму. Количественный анализ нуклеотидов проведен с помощью печатных электродов, модифицированных дисперсиями многостенных углеродных нанотрубок (УНТ) солюбилизованных катионными полимерами и диблок-сополимерами. Диапазон определяемых концентраций dsДНК составил $5 \div 500$ мкг/мл (по пику окисления G при $E=+0,58 \pm 0,02$ В), $0,5 \div 50$ мкг/мл (пик окисления A при $E=+0,86 \pm 0,02$ В), чувствительность 10^{-7} А/мкг, предел определяемых концентраций 100 нМ. Анализ однонуклеотидных замен проводили методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии. В качестве коротких фрагментов ДНК использовались синтетические олигонуклеотиды, с последовательностью соответствующей фрагменту 21 экзона гена рецептора эпидермального фактора роста EGFR. Проведен сравнительный анализ взаимодействия ДНК с лекарственными препаратами в составе фосфолипидных транспортных наносистем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ-DFG 18-44-04011 и в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

UDC 621.015.1

ELECTROANALYSIS OF DNA AS A PHARMACOLOGICAL TARGET OF DRUGS ACTIONS

Shumyantseva V.V.^{1,2}, Bulko T.V.¹, Pergushov D.V.², Sigolaeva L.V.^{1,2}

¹Institute of Biomedical Chemistry, Russia, 119121, Moscow, st. Pogodinskaya, 10

²Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia
e-mail: Viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

A method for nucleotides, oligonucleotides and DNA analysis using electrodes modified with stable dispersions of carbon nanotubes in polymer compositions of cationic polymers and diblock copolymers has been developed.

Key words: electroanalysis, DNA, carbon nanomaterials, electro-oxidation, drugs

Nucleotides, oligonucleotides, DNA, RNA are markers of numerous pathological conditions. Methods of electroanalysis of heterocyclic bases, nucleotides, DNA and RNA (direct electrochemistry of DNA bases) are based on the ability of purines (at positive potentials) and pyrimidines (at high positive potentials) to oxidize by

pH-dependent mechanism. Quantitative analysis of nucleotides was carried out using screen-printed electrodes modified by dispersions of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) solubilized by cationic polymers and diblock copolymers. The linear range of dsDNA concentrations was $5 \div 500 \mu\text{g} / \text{ml}$ (by oxidation peak G at $E=+0.58 \pm 0.02 \text{ V}$), $0.5 \div 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ (oxidation peak A at $E=+0.86 \pm 0.02 \text{ V}$), with sensitivity of $10^{-7} \text{ A}/\mu\text{g}$, and detection limit of 100 nM. The analysis of single-nucleotide point mutation was performed by differential pulse voltammetry. Synthetic oligonucleotides were used as short DNA fragments, with the sequence corresponding to the fragment of 21 exon of the EGFR epidermal growth factor receptor gene. A comparative analysis of the interaction of DNA with drugs in the phospholipid transport nanosystems was investigated.

This research was supported by the Russian Science Foundation (RSF, project no. 18-44-04011) and within the framework of the Program for Basic Research of Russian State Academy of Sciences for 2013-2020.

УДК 543.9+543.552

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ

Евтюгин Г.А., Порфирьева А.В., Стойков И.И.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18
e-mail: gevtugyn@mail.ru

Рассмотрены особенности взаимодействия нуклеиновых кислот с супрамолекулярными рецепторными структурами на платформе тиакаликс[4]арена и пиллар[5]арена и их применение в составе электрохимических ДНК сенсоров для определения биомаркеров, экотоксикантов и лекарственных препаратов.

Ключевые слова: электрохимические сенсоры, ДНК-сенсоры, макроциклические лиганды, самосборка, определение интеркаляторов ДНК

В докладе рассмотрены особенности взаимодействия ДНК с многофункциональными макроциклическими лигандами на платформе тиакаликс[4]арена и пиллар[5]арена, несущих ионизирующиеся и полярные группы, а также применение комплексов ДНК – лиганд в составе электрохимических сенсоров с импедиметрической и вольтамперометрической регистрацией сигнала. Рассмотрены условия нековалентной сборки комплексов ДНК – макроцикл и механизм генерации сигнала с участием электрохимически активных полимерных матриц и диффузионно свободных редокс-индикаторов. Приведены примеры использования разработанных электрохимических ДНК-сенсоров для регистрации активных форм кислорода, лекарственных препаратов – интеркаляторов, а также аптасенсоров для определения микотоксинов и белков.

Исследования проводили при поддержке РФФ (грант 17-73-20024).

UDC 543.9+543.552

ELECTROCHEMICAL DNA SENSORS BASED ON SUPRAMOLECULAR INTERACTIONS WITH MACROCYCLIC LIGANDS

Evtugyn G.A., Porfiryeva A.V., Stoikov I.I.

Kazan (Volga-region) federal university, Kazan, Russia
420008, Kazan, Kremlevskaya Street, 18
e-mail: gevtugyn@mail.ru

Specific interactions of nucleic acids with supramolecular receptors based on the thiacalix[4]arene and pillar[5]arene platform have been considered and utilized in the assembly of electrochemical DNA sensors for the determination of biomarkers, exotoxins and drugs.

Key words: electrochemical sensors, DNA sensors, macrocyclic ligands, self-assembling, DNA intercalator determination

In this report specific interactions of DNA with multifunctional macrocyclic ligands on the platform of thiacalix[4]arene and pillar[5]arene bearing ionized and polar functional groups have been considered together with application of such DNA-ligand complexes in the assembly of electrochemical sensors with impedimetric and voltammetric measurement mode. The condition of non-covalent assembling of DNA-macrocyclic complexes are considered and mechanism of signal generation with participation of redox active matrices and diffusionally free redox probes is discussed. Examples of application of the electrochemical DNA sensors developed are given with particular emphasis to the determination of reactive oxygen species, drug acting as intercalators and to aptasensors for the determination of mycotoxins and proteins.

Financial support of Russian Science Foundation (RSCF) is gratefully acknowledged (grant No 17-73-20024).

УДК 544.653.2; 543.645.6

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ *IN VITRO* НА ПРИМЕРЕ АМИЛОИДА-БЕТА – ПЕПТИДА, ВОВЛЕЧЁННОГО В ПАТОГЕНЕЗ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Супрун Е.В.¹, Радько С.П.¹, Хмелёва С.А.¹, Козин С.А.², Митькевич В.А.², Макаров А.А.²

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия 119121, Москва, ул. Погодинская, 10 стр. 8;

e-mail: lenasuprun@mail.ru

²ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия ГСП-1, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Сигнал электрохимического окисления амилоида-бета – пептида, играющего ключевую роль в патогенезе болезни Альцгеймера, наблюдаемый при потенциале около 0.6 В (отн. Ag/AgCl), генерируется главным образом остатками тирозина молекул-мономеров и может использоваться для количественной оценки агрегации пептида, давая уникальную информацию об убыли мономерной фракции в образце.

Ключевые слова: электрохимия, сенсор, белок, пептид, тирозин, агрегация

Патогенная агрегация белков и пептидов *in vivo* ассоциирована с развитием ряда нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера (БА). Изучение агрегации белков и пептидов *in vitro* позволяет выявить факторы, модулирующие переход молекул из мономерного состояния в агрегированное. На примере вовлечённого в патогенез БА пептида – амилоида-бета – состоящего из 42 аминокислотных остатков (Aβ42), было показано, что пик окисления Aβ42 за счёт остатка тирозина, регистрируемый при потенциале 0.6 В (отн. Ag/AgCl), начинает линейно уменьшаться с ростом размера агрегатов Aβ42 (после достижения агрегатами среднего диаметра 35 нм) в ходе спонтанной агрегации пептида [1]. Было предположено, что ток пика окисления генерируется главным образом мономерами пептида, и что исчерпание фракции мономеров по мере их включения в растущие агрегаты Aβ42 ответственно за снижение тока. Это предположение получило подтверждение при изучении взаимодействия Aβ42 и его изоформ с ионами Zn(II) и Cu(II) [2]: величина электрохимического сигнала Aβ42 была пропорциональна количеству пептида в «растворимой» фракции после осаждения Zn(II)-индуцированных агрегатов центрифугированием. Электроанализ в сочетании с методами детекции агрегатов (турбидиметрия и динамическое светорассеяние, DLS) позволил выявить двухстадийный характер механизма Zn(II)-индуцированной агрегации Aβ42: на первой стадии происходит быстрое образование олигомеров, на второй – относительно медленная их ассоциация в крупные агрегаты микронного размера [3]. При этом фосфорилирование серина-8 пептида (посттрансляционная модификация Aβ42, уменьшающая число амилоидных бляшек у трансгенных мышей с БА) блокировало вторую стадию металл-индуцированной агрегации, приводя к образованию олигомеров без последующей их ассоциации [2, 3]. Применение комбинации электрохимического метода оценки количества мономеров и методов детекции агрегатов (DLS и флуоресцентный тест с теофлавином Т) показало принципиальные особенности действия антиагреганта пептидной природы RGKLVFFGR-NH₂ на спонтанную агрегацию Aβ42, а именно изменение характера агрегации с фибриллярной на аморфную [4]. Таким образом, прямой электрохимический анализ даёт особую информацию о процессе агрегации – через оценку относительного количества пептидов и белков, находящихся в мономерном состоянии в исследуемом образце. Сочетание электроанализа с методами

оценки структуры и размера агрегатов позволяет глубже понять процесс агрегации белков и пептидов.

Доклад сделан при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг.

Литература:

1. Suprun E.V. Quantitative Aspects of Electrochemical Detection of Amyloid- β Aggregation / E.V. Suprun, S.A. Khmeleva, Y.Y. Kiseleva, S.P. Radko, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva // *Electroanalysis*. – 2016. – V. 28. – № 9. – P. 1977-1983.
2. Suprun E.V. Electrochemical detection of Zn(II)- and Cu(II)-induced amyloid- β aggregation: Quantitative aspects and application to amyloid- β isoforms / E.V. Suprun, S.P. Radko, E.A. Andreev, S.A. Khmeleva, S.A. Kozin, A.A. Makarov, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva // *J. Electroanal. Chem.* – 2017. – V. 791. – P. 152-158.
3. Suprun E.V. Electrochemical detection of Zn(II)-induced amyloid- β aggregation: Insights into aggregation mechanisms / E.V. Suprun, S.P. Radko, S.A. Kozin, V.A. Mitkevich, A.A. Makarov // *J. Electroanal. Chem.* – 2018 – V. 830-831. – P. 34-42.
4. Suprun E.V. Application of an Electrochemical Method to Evaluation of Amyloid- β Aggregation Inhibitors: Testing the RGKLVFFGR-NH₂ Peptide Antiaggregant / E.V. Suprun, S.P. Radko, T.E. Farafonova, V.A. Mitkevich, A.A. Makarov, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva // *Electroanalysis* – 2017 – V. 29. – № 12. – P. 2906-2912.

UDC 544.653.2; 543.645.6

ELECTROCHEMICAL ANALYSIS IN STUDING PROTEIN AND PEPTIDE AGGREGATION MECHANISMS IN VITRO: THE CASE OF AMYLOID-BETA IMPLEMENTED IN THE ALZHEIMER'S DISEASE PATHOGENESIS

Suprun E.V.¹, Radko S.P.¹, Khmeleva S.A.¹, Kozin S.A.², Mitkevich V.A.², Makarov A.A.²

¹Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
Pogodinskaya Street, 10/8, Moscow, 119121;
e-mail: lenasuprun@mail.ru

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia
Vavilov Street, 32, Moscow, 119991

The electrochemical oxidation signal of amyloid-beta peptide which plays a key role in pathogenesis of Alzheimer's disease is registered at the potential of 0.6 V (vs. Ag/AgCl) and generated by its monomeric molecules. This signal can serve as a quantitative estimate of peptide aggregation, providing unique information on the depletion of monomeric pool in an analyzed sample.

Key words: electrochemistry, sensor, protein, peptide, tyrosine, aggregation

Pathogenic aggregation of proteins and peptides *in vivo* is associated with a number of neurodegenerative diseases, among whom the most common is Alzheimer's disease (AD). The study of peptide and protein aggregation *in vitro* allows one to identify factors accelerating or inhibiting the transition of molecules from the monomeric to the aggregated state. On the example of Alzheimer's amyloid-beta – the 42-amino-acid-long peptide (A β 42) implemented in the AD pathogenesis – it has been shown that the A β 42 oxidation current with a maximum at 0.6 V (vs. Ag/AgCl) decreased in a linear manner with the aggregate size when the average diameter of A β 42 aggregates exceeds 35 nm in the course of spontaneous peptide aggregation [1]. It was suggested that the electrooxidation current is mostly generated by peptide monomers and that a depletion of the monomer pool due to inclusion of A β 42 molecules in aggregates is responsible for the decrease of the current. This suggestion was confirmed by studying interactions of A β 42 and its isoforms with Zn(II) and Cu(II) ions [2]: the value of A β 42 electrooxidation signal was proportional to the amount of peptides in the 'soluble' fraction after sedimentation of Zn(II)-induced A β 42 aggregates by centrifugation. Electroanalysis in combination with methods detecting aggregates (turbidimetry and dynamic light scattering, DLS) allowed us to reveal a two-stage character of the mechanism of Zn(II)-induced A β 42 aggregation: firstly, a fast formation of Zn(II)-induced A β 42 oligomers occurs and, secondly, the relatively slow assembly of these oligomers into bulky micron-sized aggregates takes place [3]. The phosphorylation of serine-8 in A β 42 (the post-translational modification of A β 42, reducing the number of amyloid deposits in transgenic AD mice) blocked the second stage of the metal-induced A β 42 aggregation, leading to the formation of peptide oligomers without their subsequent association [2, 3]. The application of electrochemical method to the monomer detection concurrently with the analysis of size and structure of A β 42 aggregates (by DLS and thioflavin T based fluorescence assay, respectively) revealed a specific effect of the peptidic antiaggregant RGKLVFFGR-NH₂ on the

spontaneous A β 42 aggregation: the antiaggregant alters the aggregation pathway from the fibrillary to amorphous aggregates formation [4]. Therefore, the direct electrochemistry can provide distinctive information such that on the relative amount of peptides or proteins in the monomeric state in the course of aggregation. The combination of electroanalysis with methods estimating the aggregate size and/or structure would allow one to get deeper insights into the process of protein and peptide aggregation.

This report was supported by State Academies of Sciences Fundamental Research Program for 2013–2020 years.

References:

1. Suprun E.V. Quantitative Aspects of Electrochemical Detection of Amyloid- β Aggregation / E.V. Suprun, S.A. Khmeleva, Y.Y. Kiseleva, S.P. Radko, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva // *Electroanalysis*. – 2016. – V. 28. – № 9. – P. 1977-1983.
2. Suprun E.V. Electrochemical detection of Zn(II)- and Cu(II)-induced amyloid- β aggregation: Quantitative aspects and application to amyloid- β isoforms / E.V. Suprun, S.P. Radko, E.A. Andreev, S.A. Khmeleva, S.A. Kozin, A.A. Makarov, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva // *J. Electroanal. Chem.* – 2017. – V. 791. – P. 152-158.
3. Suprun E.V. Electrochemical detection of Zn(II)-induced amyloid- β aggregation: Insights into aggregation mechanisms / E.V. Suprun, S.P. Radko, S.A. Kozin, V.A. Mitkevich, A.A. Makarov // *J. Electroanal. Chem.* – 2018 – V. 830-831. – P. 34-42.
4. Suprun E.V. Application of an Electrochemical Method to Evaluation of Amyloid- β Aggregation Inhibitors: Testing the RGKLVFFGR-NH₂ Peptide Antiaggregant / E.V. Suprun, S.P. Radko, T.E. Farafonova, V.A. Mitkevich, A.A. Makarov, A.I. Archakov, V.V. Shumyantseva // *Electroanalysis* – 2017 – V. 29. – № 12. – P. 2906-2912.

ЭТАПЫ УЛУЧШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРУППОВОГО ИММУНОАНАЛИЗА СУЛЬФОНИЛАМИДОВ

Буркин К.М.^{1,2}, Гальвидис И.А.¹, Лапа Г.Б.³, Зубков А.В.¹, Еремин С.А.², Буркин М.А.¹

¹ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Малый Казенный пер., 5а, Москва, 105064

²Химический Факультет, МГУ имени М. В. Ломоносова, ул. Ленинские Горы, 1, стр.3, Москва, 119234

³РНИМУ имени Пирогова, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997

e-mail: burkin-kost@yandex.ru

На основе антител с групповой специфичностью разработан иммуноанализ сульфониламидов. Ряд приемов позволил улучшить чувствительность и увеличить число определяемых сульфаниламидов по сравнению с исходным вариантом анализа. Метод адаптирован для анализа молока.

Ключевые слова: сульфаниламиды, группоспецифичный иммуноанализ, гаптены, хемилюминисценция

Сульфаниламиды (СА) – класс противомикробных средств, которые широко применяются не только в медицине, но и в ветеринарии для лечения сельскохозяйственных животных. Распространение микробной устойчивости требует принятия мер, предотвращающих контаминацию антибиотиками продуктов питания, а для осуществления контроля использовать методы, позволяющие выявлять многочисленных представителей семейства сульфаниламидов с достаточной чувствительностью. Главной задачей данного исследования было улучшение чувствительности группового иммуноферментного анализа с целью увеличения числа определяемых сульфаниламидов. Для этого было предпринято несколько подходов. Один из них предполагал использование антигенов на основе гетерологичных гаптен. Сравнительное исследование взаимодействия моноклональных антител с рядом СА-производных [1] позволило выбрать конъюгат на основе нового синтезированного бис-гаптена N,N'-1,4-фениленбис(4-аминобензсульфаниламида) [2] в качестве твердофазного антигена, который обеспечил лучшую чувствительность определения (IC₅₀) для 12 СА - < 100 нг/мл. Другая возможность улучшения параметров анализа была реализована за счет применения хемилюминесцентной системы детекции. Усиление сигнала иммуноферментной реакции позволило сдвинуть диапазон измерения СА в область меньших концентраций и увеличить по сравнению с колориметрическим анализом число определяемых аналитов до 15 (IC₅₀ < 100 нг/мл). Третий этап улучшения основывался на имитации матрикса-эффекта. В ходе адаптации анализа для определения СА в молоке были подобраны реагенты, обладающие действием, эквивалентным матрикс-эффекту молока. Показано, что при проведении реакции в среде с имитатором (сухим молоком или казеином), чувствительность анализа возрастает почти на порядок. Кроме того, этот подход значительно упрощает пробоподготовку, позволяет анализировать цельное

молоко без разведения. Таким образом, усовершенствованный вариант групп-специфического ИФА с хемилюминесцентной детекцией способен выявлять в молоке 19 различных аналитов - представителей семейства сульфаниламидов при их максимально допустимом содержании - 25 мкг/кг.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (RFMEFI60417X0198).

Литература:

1. M.A. Burkin, R.I. Nuriev, Z. Wang, I.A. Galvidis. Development of Sandwich Double-Competitive ELISA for Sulfonamides. Comparative Analytical Characteristics and Matrix Effect Resistance // Food Anal. Meth. 2018. Vol. 11. № 3. P. 663-674.
2. M.A. Burkin, G.B. Lapa, I.A. Galvidis, K.M. Burkin, A.V. Zubkov, S.A. Eremin. Three steps improving the sensitivity of sulfonamide immunodetection in milk // Anal. Meth. 2018. Vol. 10. P. 5773-5782.

STEPS TAKEN TO IMPROVE THE SENSITIVITY OF GROUP-SPECIFIC IMMUNOASSAY OF SULFONAMIDES

Burkin K.M.^{1,2}, Galvidis I.A.¹, Lapa G.B.³, Zubkov A.V.¹, Eremin S.A.², Burkin M.A.¹

¹I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Malyy Kazionnyj per. 5a, Moscow, 105064, Russia

²Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991, Russian Federation

³Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997 Russia

e-mail: burkin-kost@yandex.ru

An immunoassay of sulfonamides based on antibodies with group specificity has been developed. A number of approaches allowed to improve the assay sensitivity and increase the number of detectable sulfonamides in comparison with the original test. The method was adapted for milk analysis.

Key words: sulfonamides, group-specific immunoassay, haptens, chemiluminescence

Sulfonamides (SA) - antimicrobial agents that are widely used not only in medicine but also in veterinary for treatment of farm animals. To reduce the distribution of microbial resistance, the contamination of food with antibiotics should be controlled using methods that allow identifying numerous members of the sulfonamide family with sufficient sensitivity. The objective of this study was to improve the sensitivity of group-specific ELISA to increase the number of detectable sulfonamides. For this purpose, several approaches have been taken. One of them implied the use of antigens based on heterologous haptens. A comparative study of the interaction of monoclonal antibodies with a number of SA-derivatives [1] allowed to choose a conjugate based on novel synthesized bis-hapten N,N'-1,4-phenylenebis(4-aminobenzenesulfonamide) [2] as a coating antigen, which provided the best sensitivity detection (IC_{50}) for 12 CA - <100 ng/ml. Another possibility to improve the assay parameters was consisted in use of a chemiluminescent detection system. The enhanced chemiluminescent signal allowed us to shift the range of SA measurement towards lower concentrations and to increase the number of detectable analytes (comparing with colorimetric analysis) up to 15 (IC_{50} <100 ng/ml). The third stage of improvement was based on the imitation of the matrix-effect. During the assay adaptation for analysis of SA in milk, the reagents that simulated the matrix effect of milk were selected. It was shown that when the reaction was conducted in imitator (skim milk or casein) media, the sensitivity of the analysis increased by almost an order of magnitude. In addition, this approach simplified the sample pretreatment significantly, and permitted to analyze milk samples without dilution. Thus, an improved version of the group-specific chemiluminescent ELISA allows to detect 19 different representatives of the sulfonamide family in milk, with their maximum residue limit being 25 µg/kg.

This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, (RFMEFI60417X0198).

References:

1. M.A. Burkin, R.I. Nuriev, Z. Wang, I.A. Galvidis. Development of Sandwich Double-Competitive ELISA for Sulfonamides. Comparative Analytical Characteristics and Matrix Effect Resistance // Food Anal. Meth. 2018. Vol. 11. № 3. P. 663-674.
2. M.A. Burkin, G.B. Lapa, I.A. Galvidis, K.M. Burkin, A.V. Zubkov, S.A. Eremin. Three steps improving the sensitivity of sulfonamide immunodetection in milk // Anal. Meth. 2018. Vol. 10. P. 5773-5782.

БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ

BIOGEOTECHNOLOGY

1. БИООКИСЛЕНИЕ ИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНОГО ЖЕЛЕЗА В ПРОДУКТИВНОМ РАСТВОРЕ ХИМИЧЕСКОГО ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ, Мельникова Е.А., Меламуд В.С., Булаев А.Г.	441
BIOOXIDATION OF FERROUS IRON IONS IN A PREGNANT SOLUTION OF CHEMICAL LEACHING, Mel'nikova E.A., Melamud V.S., Bulaev A.G.	442
2. ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕДИ И ЦИНКА В СУЛЬФИДНЫХ КОНЦЕНТРАТАХ НА СКОРОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ, Уварова Т.К., Фомченко Н.В.	443
THE INFLUENCE OF CONTENT OF COPPER AND ZINC IN SULPHIDE CONCENTRATES ON THE RATE AND EFFICIENCY OF BIOLEACHING, Uvarova T. K., Fomchenko N. V.	444
3. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОРГАНИЧЕСКОГО ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДИ И ЦИНКА ИЗ НЕКОНДИЦИОННОГО ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОГО КОНЦЕНТРАТА, Елкина Ю.А., Меламуд В.С., Бодуэн А.Я., Булаев А.Г.	445
THE EFFECT OF TEMPERATURE AND ORGANIC CARBON SOURCE ON BIOLEACHING OF COPPER AND ZINC FROM SUBSTANDARD POLYMETALLIC CONCENTRATE, Elkina Y.A., Melamud V.S., Boduen A.Ya., Bulaev A.G.	446
4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМЫ XXI ВЕКА - ОСВОЕНИЯ ТЕХНОГЕННЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ МИНЕРАЛЬНОГО СЫРЬЯ, Седельникова Г.В.	447
USE OF MICROORGANISMS IN SOLVING THE PROBLEM OF THE XXI CENTURY - DEVELOPMENT OF TECHNOGENIC DEPOSITS OF MINERAL RAW MATERIALS, Sedelnikova G.V.	448
5. КУЧНОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ОСОБО УПОРНЫХ БЕДНЫХ РУД ЗОЛОТА, Т.В. Башлыкова, Е.А. Аширбаева, Е.Н. Баранова, В.В. Черепов.	449
HEAP LEACHING OF ESPECIALLY RESISTANT POOR GOLD ORES, Bashlykova T.V., Ashirbaeva E.A., Baranova E.N., Cherepov V.V.	449
6. ОКИСЛЕНИЕ ПИРРОТИНА УМЕРЕННО-ТЕРМОФИЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ, Лабырич М.В., Булаев А.Г.	450
OXIDATION OF PYRRHOTITE BY MODERATELY THERMOPHILIC MICROORGANISMS, Labyrich M.V., Bulaev A.G.	451
7. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НОВЫХ НАПРАВЛЕНИЙ В БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИИ, Булаев А.Г.	452
PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW DIRECTIONS IN BIOHYDROMETALLURGY, Bulaev A.G.	453
8. РОЛЬ ВНЕХРОМОСОМНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В МЕТАЛЛОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФОВ, Панюшкина А. Е., Бабенко В. В.	454
THE ROLE OF EXTRACHROMOSOMAL ELEMENTS IN METAL RESISTANCE OF BIOTECHNOLOGICALLY SIGNIFICANT ACIDOPHILIC CHEMOLITHOTROPHS, Panyushkina A. E., Babenko V. V.	455
9. СЕРООКИСЛЯЮЩАЯ И ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ОКИСЛЯЮЩИХ ПИРИТНЫЙ И ПИРРОТИНОВЫЙ ФЛОТОКОНЦЕНТРАТЫ, Рукосуева Г.А., Белый А.В.	455
SULFUR- AND IRON-OXIDATING ACTIVITY OF THE ASSOCIATION OF MICROORGANISMS OF OXIDIZING PYRIT AND PYRROTINO FLOTO CONCENTRATES, Rukosueva G.A., Belyi A.V.	456

УДК 62.99.29

БИООКИСЛЕНИЕ ИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНОГО ЖЕЛЕЗА В ПРОДУКТИВНОМ РАСТВОРЕ ХИМИЧЕСКОГО ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ

Мельникова Е.А.^{1,2}, Меламуд В.С.², Булаев А.Г.^{2,3}

¹Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И.Скрябина, Москва, Россия

109472, Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, 2

³Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

e-mail: lena.95.10@mail.ru

Было исследовано биоокисление ионов Fe^{2+} в продуктивном растворе выщелачивании полиметаллического концентрата умеренно-термофильными микроорганизмами. Археи рода *Acidiplasma* окисляли железо быстрее, чем бактерии рода *Sulfobacillus*, а внесение минеральных солей и органических субстратов по разному влияло на скорость окисления железа разными штаммами.

Ключевые слова: ацидофильные микроорганизмы, окисление железа

Был исследован процесс биоокисления ионов Fe^{2+} в продуктивном растворе, химического выщелачивания медно-цинкового концентрата, который содержал 3.4 г/л Fe^{3+} , 16.2 г/л Fe^{2+} , 1.6 г/л Cu^{2+} и 11.9 г/л Zn^{2+} . Эксперименты проводили с умеренно-термофильными и термотолератными штаммами *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. thermotolerans* Kr1^T, *Acidiplasma* sp. MBA-1, *A. aeolicum* V1^T, *A. cupricumulans* BH2^T, мезофильным штаммом *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFBK и ассоциацией микроорганизмов, осуществлявшей процесс биовыщелачивания медно-цинкового концентрата, в которой доминировали *S. benefaciens* и *Ferroplasma acidiphilum* [1]. Продолжительность экспериментов составляла 16 сут, штаммы культивировали на шейкере (200 об/мин.) во флаконах с 3 мл среды при оптимальных температурах. Начальная численность клеток составляла около 1×10^7 кл/мл. Исследовали влияние внесения в раствор минеральных солей ($(NH_4)_2SO_4$, KCl, $MgSO_4$ и K_2HPO_4) и органического источника углерода (0.01% барды и 0.01% мелассы) на скорость окисления Fe^{2+} . Штамм *A. cupricumulans* BH2^T окислил от 45 до 75% железа, быстрее всего железо окислялось в растворе с минеральными солями и органическими субстратами (75%). В экспериментах со штаммом *A. aeolicum* V1^T внесение минеральных солей и органических источников углерода не позволило повысить скорость окисления (было окислено 33- 43% железа), быстрее всего окислялось железо в продуктивном растворе без дополнительных компонентов (43%). Внесение минеральных солей и органических субстратов значительно повысило скорость окисления железа штаммом *Acidiplasma* sp. MBA-1 (в растворе с минеральными солями и органическими субстратами было окислено 76% железа), в растворе без дополнительных компонентов было окислено около 40% Fe^{2+} . Штамм *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1 окислил около 30% во всех экспериментах. В экспериментах со штаммом *S. thermotolerans* Kr1^T в растворах без дополнительных компонентов и с органическими субстратами было окислено 17 и 19% Fe^{2+} соответственно, а в растворах с минеральными солями, а также солями и органическими субстратами было окислено 26 и 29% соответственно. *A. ferrooxidans* TFBK окислил в растворе с минеральными солями около 32% Fe^{3+} , тогда как в других вариантах степень окисления составила около 15%. Смешанная культура окислила железо полностью в эксперименте с продуктивным раствором без дополнительных компонентов, а в других вариантах было окислено от 39 до 51% железа. Штаммы архей рода *Acidiplasma* окисляли железо в продуктивном растворе быстрее, чем штаммы бактерий рода *Sulfobacillus*, что может объясняться их более высокой устойчивостью к высоким концентрациям ионов железа [2]. Наиболее быстрым было окисление ионов Fe^{2+} микробной ассоциацией, что может объясняться длительной адаптацией к высоким концентрациям ионов металлов в процессе биоокисления концентрата [1].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта N 16-34-60053 мол_а_дк.

Литература:

1. Bulaev A.G., Melamud V.S. Bioleaching of arsenic-bearing sulfide copper-zinc concentrate // *Journal of Biotechnology*. – 2018. – V. 280S. – S49.

2. Bulaev A.G. Effect of ferric sulfate on activity of moderately thermophilic acidophilic iron-oxidizing microorganisms // *Microbiology*. – 2017. – V. 86. – No. 4. – P. 469–475.

UDC 62.99.29

BIOOXIDATION OF FERROUS IRON IONS IN A PREGNANT SOLUTION OF CHEMICAL LEACHING

Mel'nikova E.A.^{1,2}, Melamud V.S.², Bulaev A.G.^{2,3}

¹Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology n.a. K.I. Skryabin, Moscow, Russia
 109472, Moscow, Scryabin Str., 23

²Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences; Moscow, Russia
 119071, Moscow, Leninsky Ave, 33, bld. 2

³Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
 119234, Moscow, Leninskiye Gory, 1, bld. 12
 e-mail: lena.95.10@mail.ru

The biooxidation of Fe²⁺ ions in the pregnant leach solution of a polymetallic concentrate by moderately thermophilic microorganisms was studied. Archea of the genus *Acidiplasma* oxidized iron faster than bacteria of the genus *Sulfobacillus*, and addition of mineral salts and organic nutrients had different effects on the rate of oxidation of iron by different strains.

Key words: acidophilic microorganisms, ferrous iron oxidation

Biooxidation of Fe²⁺ ions in pregnant solution of chemical leaching of copper-zinc concentrate, which contained 3.4 g/l Fe³⁺, 16.2 g/l Fe²⁺, 1.6 g/l Cu²⁺, and 11.9 g/l Zn²⁺ was studied. Experiments were performed with moderately thermophilic and thermotolerant strains *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. thermotolerans* Kr1^T, *Acidiplasma* sp. MBA-1, *A. aeolicum* V1^T, *A. cupricumulans* BH2^T, mesophilic strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFBK, and population of microorganisms that carried out bioleaching of copper-zinc concentrate, in which *S. benefaciens* and *Ferroplasma acidiphilum* were predominant [1]. The duration of the experiments was 16 days, the strains were cultured on a shaker (200 rpm) in bottles with 3 ml of the solution at optimum temperatures. The initial cell number was about 1×10⁷ cell/ml. The effect of mineral salts ((NH₄)₂SO₄, KCl, MgSO₄ и K₂HPO₄) and an organic carbon source (0.01% stillage and 0.01% molasses) addition on rate of Fe²⁺ oxidation was studied. Strain *A. cupricumulans* BH2^T oxidized of 45 to 75% iron, most rapidly iron was oxidized in solution with mineral salts and organic substrates (75%). In experiments with the *A. aeolicum* V1^T, addition of mineral salts and organic carbon sources did not allow to increase oxidation rate (33–43% of iron was oxidized), and iron was most rapidly oxidized in the pregnant solution without additional components (43%). The addition of mineral salts and organic substrates significantly increased the rate of ferrous iron oxidation of by the strain *Acidiplasma* sp. MBA-1 (in the solution with mineral salts and organic substrates 76% of iron was oxidized), and about 40% of Fe²⁺ was oxidized in a solution without additional components. Strain *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1 oxidized about 30% of Fe²⁺ in all experiments. In experiments with the *S. thermotolerans* Kr1^T, 17 and 19% of Fe²⁺ were oxidized in solutions without additional components and with organic substrates, respectively, while in the solutions with mineral salts, as well as with salts and organic substrates, 26 and 29% of ferrous iron was oxidized. *A. ferrooxidans* TFBK oxidized in solution with mineral salts about 32% of Fe²⁺, while in other variants rate of oxidation was about 15%. Mixed culture oxidized iron completely in the experiment with a productive solution without additional components, while in other variants, of 39 to 51% of ferrous iron was oxidized. The strains of the archaea of the genus *Acidiplasma* oxidized iron in the productive solution faster than bacteria of the genus *Sulfobacillus*, which may be explained by their higher resistance to high concentrations of iron ions [2]. The most rapid Fe²⁺ oxidation by mixed microbial population can be explained by the long-term adaptation to high concentrations of metal ions during biooxidation of the concentrate [1].

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project no. 16-34-60053 mol_a_dk.

References:

1. Bulaev A.G., Melamud V.S. Bioleaching of arsenic-bearing sulfide copper–zinc concentrate // *Journal of Biotechnology*. – 2018. – V. 280S. – S49.
2. Bulaev A.G. Effect of ferric sulfate on activity of moderately thermophilic acidophilic iron-oxidizing microorganisms // *Microbiology*. – 2017. – V. 86. – No. 4. – P. 469–475.

УДК 60+669

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕДИ И ЦИНКА В СУЛЬФИДНЫХ КОНЦЕНТРАТАХ НА СКОРОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ

Уварова Т.К., Фомченко Н.В.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия 125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Ленинский пр-т, 33, 2, 119071
e-mail: red-phlox@inbox.ru

Исследовано биовыщелачивание сульфидных медно-цинковых с концентратов с применением мезофильной и умеренно термофильной ассоциаций ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Установлено, что скорость выщелачивания цинка зависит не только от его содержания, но и от соотношения между содержанием меди и цинка в сульфидных продуктах. Показано, что удельные скорости выщелачивания меди практически не отличались для всех исследуемых продуктов. Однако удельные скорости выщелачивания цинка были тем выше, чем больше меди в выщелачиваемых продуктах.

Ключевые слова: биовыщелачивание, медно-цинковые концентраты, ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы

Коллективные медно-цинковые концентраты, полученные из руд уральского региона, с трудом поддаются разделению на кондиционные медные и цинковые. Возможными способами их переработки может быть технология биовыщелачивания,

Исследовано биовыщелачивание различных сульфидных медно-цинковых концентратов с применением мезофильной и умеренно термофильной культур ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Установлено, что средние скорости выщелачивания меди прямо пропорционально зависят от ее содержания в выщелачиваемом продукте. Скорость выщелачивания цинка зависит не только от его содержания, но и от соотношения между медью и цинком в сульфидных концентратах. Так, при соотношении между содержанием меди и цинка, равным 7.3 скорость биовыщелачивания меди составила 55.3 мг/л/сут, а цинка – 82.3 мг/л/сут. При снижении соотношения содержаний меди и цинка до 2.9 скорость биовыщелачивания цинка увеличивалась до 146 мг/л/сут, а меди – снижалась до 42.2 мг/л/сут, дальнейшее снижение соотношения содержание меди и цинка в сульфидных концентратах до 1.7 и 1.4 увеличивали скорость выщелачивания цинка до 151 и 164, а меди снижали до 28.3 и до 27.6 мг/л/сут соответственно.

Показано, что удельные скорости выщелачивания меди практически не отличались для всех исследуемых концентратов, что, вероятно связано с тем, что этот параметр зависит только от энергии кристаллической решетки халькопирита. При всех соотношениях между содержанием меди и цинка в выщелачиваемых продуктах эта скорость колебалась между близкими значениями – 27.4–28.8 мг/г/сут. Однако удельные скорости выщелачивания цинка были тем выше, чем больше меди в выщелачиваемых продуктах (от 216.8 до 311.8 мг/г/сут), что свидетельствует о наличии гальванического взаимодействия между сульфидными минералами.

Состав твердой фазы после выщелачивания наиболее перспективных по соотношению содержаний меди и цинка концентратов представлен в таблице.

Таблица 1. Состав твердой фазы (осадков) после биовыщелачивания (время – 5 сут).

Содержание в исходных концентратах, %		Выход осадков, %	Извлечение в осадок, %		Содержание, %	
Cu	Zn		Cu	Zn	Cu	Zn
19.2	2.6	76.0	91.3	0	23.1	0
14.7	5.0	71.0	88.4	0	18.3	0

Из данных таблицы следует, что при полном извлечении цинка в жидкую фазу (100%) извлечение меди было невелико и составляло от 8.7 до 11.6 %, а в осадке оставалось 91.3 – 88.4% меди. При этом

содержание меди в осадках выщелачивания значительно повышалось, примерно, на 4% для каждого концентрата. Полученные кондиционные медные концентраты, практически не содержащие цинка, являются благоприятным сырьем для пирометаллургической переработки.

UDC 60+669

THE INFLUENCE OF CONTENT OF COPPER AND ZINC IN SULPHIDE CONCENTRATES ON THE RATE AND EFFICIENCY OF BIOLEACHING

Uvarova T. K., Fomchenko N. V.

*Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Faculty of Biotechnology and Industrial Ecology, Department of Biotechnology, Miusskaya sq. 9, Moscow, Russia, 125047
Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky Ave., 33, bld. 2, Moscow, Russia, 119071
e-mail: red-phlox@inbox.ru*

The bioleaching of sulfide copper-zinc concentrates with the use of mesophilic and moderately thermophilic associations of acidophilic chemolithotrophic microorganisms was investigated. It was found that the rate of zinc leaching depends not only on its content, but also on the ratio between the content of copper and zinc in sulfide products. It is shown that the specific rates of copper leaching did not differ for all the studied products. However, the specific rates of zinc leaching were the higher the more copper content in the leached products was.

Key words: bioleaching, copper-zinc concentrates, acidophilic chemolithotrophic microorganisms

Collective copper-zinc concentrates, obtained from the ores of the Ural region, are difficult to be divided into conditioned copper and zinc concentrates. Potential ways of their processing can be the technology of bioleaching.

We investigated the bioleaching of different sulphide copper-zinc concentrates with the use of mesophilic and moderately thermophilic cultures of acidophilic chemolithotrophic microorganisms. It was found that the average rate of copper leaching is directly proportional to the content of copper in the leached product. The rate of zinc leaching depends not only on its content, but also on the ratio between copper and zinc in sulfide concentrates. Thus, at a ratio between copper and zinc content equal to 7.3, the rate of copper bioleaching was 55.3 mg/l/day, and zinc – 82.3 mg/l/day. By reducing the content ratio of copper and zinc to 2.9 the rate of bioleaching of zinc was increased to 146 mg/l/day, and copper declined to 42.2 mg/l/day. Further reducing the ratio of content of copper and zinc in sulphide concentrates to 1.4 and 1.7 increased the rate of zinc leaching up to 151 and 164, and the copper was reduced to 28.3 and up to 27.6 mg/l/day, respectively.

It is shown that the specific rates of copper leaching did not differ essentially for all the studied concentrates, which is probably due to the fact that this parameter depends only on the energy of the crystal lattice of chalcopyrite. At all ratios between the content of copper and zinc in leached products this rate fluctuated between close values – 27.4–28.8 mg/g/day. However, the specific rates of zinc leaching were higher, the more copper in the leached products (from 216.8 to 311.8 mg/g / day), which indicates the presence of galvanic interaction between sulfide minerals.

The composition of the solid phase after leaching of the most promising by the ratio of copper and zinc concentrates is presented in the table.

Table 1. Composition of the solid phase (residues) after bioleaching (time – 5 days).

The contents in the source concentrate, %		Residue output, %	Extraction to residue, %		Content, %	
Cu	Zn		Cu	Zn	Cu	Zn
19.2	2.6	76.0	91.3	0	23.1	0
14.7	5.0	71.0	88.4	0	18.3	0

It follows from the Table 1 that with the complete extraction of zinc into the liquid phase (100%), the extraction of copper was small and ranged from 8.7 to 11.6 %, and 91.3 – 88.4% of copper remained in the residue. The copper content in leaching residues was significantly increased by about 4% for each concentrate. The obtained conditioned copper concentrates, which practically do not contain zinc, are a favorable raw material for pyrometallurgical processing.

УДК 62.99.29

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОРГАНИЧЕСКОГО ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДИ И ЦИНКА ИЗ НЕКОНДИЦИОННОГО ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОГО КОНЦЕНТРАТА

Елкина Ю.А.^{1,2}, Меламуд В.С.¹, Бодуэн А.Я.^{3,4}, Булаев А.Г.^{1,2}

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, 2

²Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³СП ЗАО «Изготовление, Внедрение, Сервис», Санкт-Петербург, Россия
199155, Санкт-Петербург, ул. Железноводская, д. 11, лит. А

⁴Санкт-Петербургский горный университет, Санкт-Петербург, Россия
199106, Санкт-Петербург, Васильевский остров, 21 линия, 2
e-mail: yolkina@mail.ru

Была исследована зависимость биовыщелачивания меди и цинка из полиметаллического концентрата от температуры, а также присутствия органического источника углерода и NaCl в среде, и показано, что эти факторы существенно влияют на процесс биовыщелачивания цветных металлов.

Ключевые слова: биогидрометаллургия, сульфидные минералы, полиметаллические концентраты

Цветные металлы из сульфидных руд извлекаются, главным образом, с помощью пирометаллургических технологий, но для пирометаллургии является проблемой переработка мышьяксо-содержащих руд и труднообогатимых полиметаллических руд, из которых невозможно получить кондиционные концентраты из-за взаимного прорастания сульфидных минералов [1, 2]. Биогидрометаллургические технологии широко применяются для переработки мышьяксо-содержащих золотосодержащих концентратов, а также для извлечения цветных металлов из некондиционных концентратов, в частности, мышьяксо-содержащих [2, 3]. Целью данной работы являлось изучение зависимости биовыщелачивания меди и цинка из мышьяксо-содержащего медно-цинкового концентрата от температуры, а также присутствия органического источника углерода и NaCl в среде. Основными минералами концентрата были халькопирит, теннантит, сфалерит и пирит. Концентрат содержал 16% Cu, 5.3% Zn и 1.36% As. В работе использовалась смешанная культура умеренно термофильных ацидофильных микроорганизмов, состоящая из штаммов *Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH-1 и *Acidiplasma* sp. MBA-1. Инокуляцию проводили таким образом, чтобы начальная численность каждого штамма составляла около 1×10^7 кл/мл. Опыты проводили в колбах со 100 мл минеральной среды и 2 г концентрата на ротационной качалке в течение 20 сут. при температурах от 40°C до 60°C с шагом в 5°C. В одном из вариантов эксперимента в среду вносили 0.02% дрожжевого экстракта в качестве дополнительного источника углерода для миксотрофных микроорганизмов (миксотрофные условия). В другом варианте в среду не вносили дополнительных источников углерода (автотрофные условия). Кроме того, в одном из вариантов эксперимента (в миксотрофных условиях при 50°C) в среду добавляли 100 mM NaCl. Наибольшее количество меди из концентрата было выщелочено в миксотрофных условиях при 60°C (55%), при этом в этих условиях было выщелочено 63% цинка. В автотрофных условиях наибольшее количество меди было выщелочено при 50°C (46%), а цинка – при 40 и 50°C (67 и 66%). В миксотрофных условиях при 50°C было выщелочено 38 и 56% Cu и Zn. Добавление в среду 100 mM NaCl позволило в аналогичных условиях выщелочить 46 и 86% меди и цинка. Таким образом, было показано, что биовыщелачивание металлов зависело от температуры и присутствия в среде органического источника углерода и NaCl.

Исследование было выполнено при поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-6639.2018.8.

Литература:

1. Filippou D., St-Germain P., Grammatikopoulos T. Recovery of metal values from copper – arsenic minerals and other related resources // *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*. – 2007. – V. 28 (4). – P. 247–298.
2. Gericke M., Neale J. W., Van Staden P. J. A Mintek perspective of the past 25 years in minerals bioleaching // *J. S. Afr. Inst. Mining and Met.* – 2009. – V. 109. – P. 567–585.
3. Neale J., Seppälä J., Laukka A., van Aswegen P., Barnett S., Gericke M. The MONDO Minerals Nickel Sulfide Bioleach Project: From Test Work to Early Plant Operation // *Solid State Phenomena*. – 2017. – V. 262. – P. 28–32.

UDC 62.99.29

THE EFFECT OF TEMPERATURE AND ORGANIC CARBON SOURCE ON BIOLEACHING OF COPPER AND ZINC FROM SUBSTANDARD POLYMETALLIC CONCENTRATE

Elkina Y.A.^{1,2}, Melamud V.S.¹, Boduen A.Ya.^{3,4}, Bulaev A.G.^{1,2}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences; Moscow, Russia
 119071, Moscow, Leninsky Ave, 33, bld. 2

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University; Moscow, Russia
 119234, Moscow, Leninskiye Gory, 1, bld. 12

³SP ZAO "IVS", Saint Petersburg, Russia
 199155, Sankt-Peterburg, ulitsa Zheleznovodskaya, d. 11/A

⁴St. Petersburg Mining University; Saint-Petersburg, Russia
 199106, St. Petersburg, 21st Line, 2
 e-mail: yolkina@mail.ru

The dependence of copper and zinc bioleaching from a polymetallic concentrate on temperature as well as on the presence of organic carbon source and NaCl in the medium was studied. It was shown that these factors significantly influenced the bioleaching non-ferrous metals.

Key words: biohydrometallurgy, sulfide minerals, polymetallic concentrates

Nonferrous metals are mainly extracted from sulfide ores using pyrometallurgical technologies. At the same time, the processing of arsenic containing ores as well as refractory polymetallic ores from which high-quality nonferrous metal concentrates may not be obtained due to the fine intergrowth of sulfide minerals is a problem for pyrometallurgy [1, 2]. Biohydrometallurgical technologies are widely used to process arsenic-containing gold-containing concentrates, and can also be used to extract non-ferrous metals from substandard concentrates, including arsenic-containing ones [2, 3]. The goal of the present work was to study the dependence of copper and zinc bioleaching from arsenic-containing copper-zinc concentrate on temperature as well as on the presence of organic carbon source and NaCl in the medium. Chalcopyrite, tennantite, sphalerite and pyrite were the main minerals of the concentrate. The concentrate contained 16% of Cu, 5.3% of Zn, and 1.36% of As. Mixed culture of moderately thermophilic acidophilic microorganisms consisting of the strains *Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH-1, and *Acidiplasma* sp. MBA-1 was used for the experiments. The strains were inoculated so that the initial number of each strain was about 1×10^7 cell/mL. The experiments were carried out in flasks with 100 ml of mineral medium and 2 g of concentrate on a rotary shaker for 20 days at temperatures from 40°C to 60°C in increments of 5°C. In the first variant of the experiment, the medium was supplemented with 0.02% of yeast extract as an additional carbon source for mixotrophic microorganisms (mixotrophic conditions). In the second variant, no additional carbon sources were supplemented into the medium (autotrophic conditions). In one variant of the experiment (under mixotrophic conditions at 50°C), 100 mM NaCl was added to the medium. The rate of copper extraction from the concentrate was the highest under mixotrophic conditions at 60°C (55%). Under these conditions 63% of zinc was leached. The rate of copper extraction under autotrophic conditions was the highest at 50°C (46%), while rate of zinc leaching was the highest at 40 and 50°C (67 and 66%). Under mixotrophic conditions at 50°C, 38 and 56% Cu and Zn were leached, respectively. The addition of 100 mM NaCl to the medium under the same conditions made it possible to leach out 46 and 86% of copper and zinc, respectively. Thus, it was shown that the bioleaching of metals depended on temperature and the presence of organic carbon source and NaCl in the medium.

The work was supported by the President Grant of the Russian Federation, grant No. MK-6639.2018.8.

References:

1. Filippou D., St-Germain P., Grammatikopoulos T. Recovery of metal values from copper – arsenic minerals and other related resources // *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*. – 2007. – V. 28 (4). – P. 247–298.
2. Gericke M., Neale J. W., Van Staden P. J. A Mintek perspective of the past 25 years in minerals bioleaching // *J. S. Afr. Inst. Mining and Met.* – 2009. – V. 109. – P. 567–585.
3. Neale J., Seppälä J., Laukka A., van Aswegen P., Barnett S., Gericke M. The MONDO Minerals Nickel Sulfide Bioleach Project: From Test Work to Early Plant Operation // *Solid State Phenomena*. – 2017. – V. 262. – P. 28–32.

УДК 622.7:622.342.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМЫ XXI ВЕКА - ОСВОЕНИЯ ТЕХНОГЕННЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ МИНЕРАЛЬНОГО СЫРЬЯ

Седельникова Г.В.

«Геотехнологический центр» АО «Росгеология», Москва, Россия
17246, г. Москва, ул. Херсонская, д.43, корп.3
e-mail: gsedelnikova@mail.ru

На основании анализа минерально сырьевой базы рудного и техногенного сырья отмечено снижение качества руд и наличие больших объемов отходов горно-металлургического производства. Выявлены благоприятные предпосылки для освоения месторождений техногенного сырья. В качестве перспективной технологии рассматривается биовыщелачивание (биоокисление) лежалых сульфидных хвостов обогатительных фабрик, содержащих цветные и благородные металлы. Приведены примеры промышленной практики и показана перспективность научных разработок.

Ключевые слова: бедные руды, лежалые хвосты обогатительных фабрик, цветные, благородные металлы, биовыщелачивание, биоокисление

В последнее десятилетие в мире в переработку все больше вовлекаются бедные, убогие и труднообогатимые руды сложного вещественного состава, поскольку в общих объемах минерального сырья уменьшается доля богатых и простых по составу руд, растут затраты на переработку бедных руд. Эта тенденция с каждым десятилетием становится все более ярко выраженной.

В результате многолетней эксплуатации месторождений полезных ископаемых накопились огромные запасы отходов горно-металлургического производства, в том числе лежалые хвосты обогатительных фабрик, в которых содержание полезных компонентов (золото, серебро, медь, цинк, свинец, и др.) нередко приближается к содержанию в рудах эксплуатируемых месторождений. Благоприятными предпосылками для освоения месторождений лежалых хвостов является нахождение их на поверхности земли в горнопромышленных районах с развитой инфраструктурой, тонкое измельчение материала. Наличие последних двух факторов значительно сокращает затраты на добычу, применение дорогостоящих и наиболее энергоемких операций дробления и измельчения, а также создание инфраструктуры. Накопленные и текущие хвосты обогащения руд цветных и благородных металлов рассматриваются в качестве резервной минерально-сырьевой базы XXI века.

Хвосты обогащения содержат минералы тяжелых металлов, серу, мышьяк, сурьму и др. токсичные компоненты и являются источником загрязнения окружающей среды. Большие запасы и высокая потенциальная стоимость полезных компонентов (благородные, цветные, редкие металлы и др.) стимулирует вовлечение отходов во вторичную переработку по экономическим и экологическим соображениям. В качестве перспективной технологии рассматривается технология биовыщелачивания (биоокисления) сульфидных минералов с помощью микроорганизмов, которая признана во всем мире «зеленой».

Ключевую роль в процессе биовыщелачивания металлов из минералов играют ацидофильные микроорганизмы. С помощью микроорганизмов сульфидные минералы, содержащие благородные и цветные металлы, окисляются. Цветные металлы переходят в раствор, из которого выделяются в товарную продукцию. Благородные металлы после «вскрытия» из сульфидов остаются в твердой фазе и извлекаются в процессе последующего растворения в цианидном или другом растворителе. Токсичные компоненты мышьяк, сурьма, железо, сера осаждаются в виде безопасных нерастворимых соединений. Биотехнологии извлечения благородных и цветных металлов из руд, концентратов и отходов горно-металлургического производства являются наиболее простыми, безопасными и экономически выгодными по сравнению с альтернативными методами переработки, такими, как обжиг, плавка и автоклавное выщелачивание.

В докладе приводится анализ мировой практики переработки бедных руд цветных и благородных металлов и техногенных отходов с использованием микроорганизмов. Отмечается, что, несмотря на положительные результаты выполненных научных исследований и пилотных испытаний технологий биовыщелачивания (биоокисления) металлов, промышленная переработка отходов минерального сырья проводится в довольно ограниченном масштабе. Принимая во внимание снижение качества минерально-сырьевой базы металлов и наличие больших запасов техногенных отходов горно-металлургического

производства, перед исследователями и производством стоит задача разработки и внедрения биотехнологий в промышленность на основе научно-обоснованного выбора микроорганизмов, способных к активной жизнедеятельности в промышленных условиях; разработки оптимальных параметров и режимов биовыщелачивания (биоокисления) минералов, извлечения металлов и охраны окружающей среды.

UDC 622.7:622.342.1

USE OF MICROORGANISMS IN SOLVING THE PROBLEM OF THE XXI CENTURY - DEVELOPMENT OF TECHNOGENIC DEPOSITS OF MINERAL RAW MATERIALS

Sedelnikova G.V.

*«Geotechnological centre» of JSC «Rosgeology, Moscow, Russia
 117146, Moscow, Hersonskaya street, house 43, k.3
 e-mail: gsedelnikova@mail.ru*

Based on the analysis of the mineral resource base of ore and technogenic raw materials, a decrease in the quality of ores and the presence of large volumes of mining and metallurgical wastes were noted. The favorable preconditions for the development of deposits of technogenic raw materials are revealed. Bio-leaching (bio-oxidation) of old sulphide tailings of processing plants containing non-ferrous and precious metals is considered as a promising technology. Examples of industrial practice are given and the promise of scientific research is shown.

Key words: poor ores, old tailings of processing plants, non-ferrous, precious metals, bioleaching, biooxidation

In the last decade in the world, poor, squalid and refractory ores of complex material composition are increasingly involved in processing, since the share of rich and simple ores in total volumes of mineral raw materials decreases. Consequently, the costs of processing poor ores are rising. This trend is becoming more pronounced with each decade.

As a result of long-term exploitation of mineral deposits, huge reserves of mining and metallurgical production have accumulated, including the old tailings of processing plants, in which the content of useful components (gold, silver, copper, zinc, lead, etc.) often approaches ores of exploited deposits. Favorable prerequisites for the development of deposits of old tailings is their location on the surface of the earth in mining areas with a developed infrastructure, fine grinding of the material. The presence of the latter two factors significantly reduces the cost of extraction, the use of expensive and most energy-intensive crushing and grinding operations, as well as the creation of infrastructure. The accumulated and current tailings of the enrichment of ores of non-ferrous and noble metals are considered as a reserve mineral resource base of the XXI century.

Tailings of enrichment contain heavy metal minerals, sulfur, arsenic, antimony and other toxic components and are a source of environmental pollution. Large reserves and high potential cost of useful components (noble, non-ferrous, rare metals, etc.) stimulate the involvement of waste in secondary processing for economic and environmental reasons. The technology of bioleaching (biooxidation) of sulfide minerals containing metals with the help of microorganisms, which is recognized worldwide, is considered a promising technology.

Acidophilic microorganisms play a key role in the process of bioleaching metals from minerals. With the help of microorganisms, sulfide minerals containing precious and non-ferrous metals are oxidized. Non-ferrous metals go into solution, from which they are released into marketable products. After the "liberation" from sulphides, the precious metals remain in the solid phase and are recovered during the subsequent dissolution in cyanide or another solvent. Toxic components arsenic, antimony, iron, sulfur are deposited in the form of safe insoluble compounds. Biotechnologies for extracting precious and non-ferrous metals from ores, concentrates, and wastes of mining and smelting production are the simplest, safest, and most cost-effective compared to alternative processing methods, such as roasting, smelting, and pressure leaching.

The report provides an analysis of the world practice of processing the poor ores of non-ferrous and noble metals and industrial wastes using microorganisms. It is noted that, despite the positive results of the research and pilot tests of bioleaching technologies (bio-oxidation) of metals, industrial processing of mineral waste is carried out on a rather limited scale. Taking into account the decline in the quality of the mineral and raw material base of metals and the presence of large reserves of industrial wastes from mining and metallurgical production, researchers and production are faced with the task of developing and speeding up the time-limits for introducing biotechnol-

ologies into the industry based on a scientifically based choice of microorganisms capable of active life in industrial conditions; development of optimal parameters and modes of bioleaching (bio-oxidation) of minerals, extraction of metals and environmental protection.

УДК 622.7:577.4

КУЧНОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ОСОБО УПОРНЫХ БЕДНЫХ РУД ЗОЛОТА

Т.В. Башлыкова, Е.А. Аширбаева, Е.Н. Баранова, В.В. Черепов

НИТУ «МИСиС», ООО «НВП Центр-ЭСТАгео», 119049, Москва, Ленинский проспект, дом 4

Показана возможность повышения извлечения золота на более 57% из особо упорных малосульфидных руд с коллоидным золотом посредством биоокисления упорных фаз.

Ключевые слова: биовскрытие особо упорных фаз, золото, штабель

Минеральное сырье, поступающее в переработку сегодня, характеризуется сложным вещественным составом, особенности которого определяют технологию. Поиск рациональных решений извлечения ценных компонентов приводит к комплексированию различных способов. В рамках лабораторных исследований была изучена особо упорная малосульфидная золотосодержащая руда, представленная богатым (10 г/т) и бедным (1,5 г/т) технологическими сортами, совместная переработка которых экономически не целесообразна.

При изучении вещественного состава бедной золотосодержащей руды установлено присутствие невидимого (коллоидного) золота в составе всех минералов с общей долей упорной нецианируемой фазы более 77%.

На стадии лабораторных испытаний была определена принципиальная возможность биоокисления упорных фаз и достаточно высокая эффективность последующего цианирования, позволяющего увеличить степень извлечения золота с 22,6 до 80,2%. Этот показатель был подтвержден в ходе укрупненных испытаний в перколяционных колоннах в исследовательском центре Недропользователя.

В настоящее время проводится опытно-промышленные испытания разработанной технологии на упорной бедной руде массой 10 тыс. тонн крупностью -50+0 мм, уложенной в штабель кучного выщелачивания в регионе с годовой амплитудой температурных колебаний более 100°C. Мониторинг состояния руды за 9 месяцев (включая зимний период) зафиксировал дезагрегацию рудных кусков и интенсивное изменение их цвета с серого на коричневый, свойственные процессу биоокисления.

Таким образом, процесс кучного выщелачивания бедной золотосодержащей особо упорной руды с предварительным биоокислением может быть реализован в режиме малозатратного кучного выщелачивания даже в условиях Крайнего Севера.

UDC 622.7:577.4

HEAP LEACHING OF ESPECIALLY RESISTANT POOR GOLD ORES

Bashlykova T.V., Ashirbaeva E.A., Baranova E.N., Cherepov V.V.

MISiS, LLC «SIE Center-ESTAgeo», Leninsky prospect, 4, Moscow, 119049

The possibility of increasing gold recovery by more than 57% from especially resistant low-sulphide ores with colloidal gold through biooxidation of resistant phases is shown.

Key words: bio-discovery of especially resistant phases, gold, stockpile

Mineral raw materials entering processing today characterized by a complex material composition, the features of which determine technology. The search for rational solutions to extract valuable components leads to the creation of various complex methods. In the framework of laboratory studies, especially resistant low-sulphide gold-bearing ore, represented by rich (10 g / t) and poor (1.5 g / t) technological sorts, the joint processing of which is not economically feasible, was studied.

In the study of the material composition of poor gold-bearing ore, the presence of invisible (colloidal) gold was

found in the composition of all minerals with a total quantity of refractory noncyanated phase of over 77%.

At the laboratory testing stage, the principal possibility of biooxidation of refractory phases and the relatively high efficiency of subsequent cyanidation were determined, which allows increasing the degree of gold recovery from 22.6 to 80.2%. This indicator was confirmed in the course of enlarged tests in percolation columns at the Subsoil User's research center.

At present, pilot-industrial tests of the developed technology are being carried out on resistant poor ore weighing 10 thousand tons with a particle size of $-50 + 0$ mm, stacked in a heap leach pile in a region with an annual amplitude of temperature fluctuations of more than 100°C . Monitoring of the ore condition during 9 months (including the winter period) recorded disaggregation of the ore pieces and an intensive change of their color from gray to brown, typical of the biooxidation process.

Thus, the process of heap leaching of poor gold-bearing especially resistant ore with preliminary biooxidation can be implemented in the mode of low-cost heap leaching even in the conditions of the Far North.

УДК 62.99.29

ОКИСЛЕНИЕ ПИРРОТИНА УМЕРЕННО-ТЕРМОФИЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Лабырич М.В.¹, Булаев А.Г.^{1,2}

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия, 119071 Москва, Ленинский пр-т, д. 33, к. 2

²Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, д. 1
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Представлены данные о скорости окисления пирротина различными микроорганизмами - представителями групп, доминирующих в процессах биоокисления. Было показано, что скорости окисления минерала разными микроорганизмами различались и во многом зависели от их способности окислять элементарную серу

Ключевые слова: ацидофильные микроорганизмы; сульфидные минералы, пирротин, сера

Механизмы взаимодействия ацидофильных микроорганизмов и сульфидных минералов достаточно хорошо изучены. Если самый распространённый сульфидный минерал, пирит, подвергается окислению посредством тиосульфатного механизма, где тиосульфат является главным интермедиатом, окисляющимся до сульфата, то большинство сульфидных минералов окисляются посредством полисульфидного механизма, для которого характерно образование полисульфидов в качестве интермедиата и элементарной серы. В нашей предыдущей работе мы исследовали процесс окисления пирита умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами [1]. Было показано, что ключевую роль в процессе окисления пирита играют железooksисляющими микроорганизмы, тогда как серooksисляющие микроорганизмы играли в процессе биоокисления пирита косвенную роль, снабжая миксотрофные железooksисляющие штаммы органическим источником углерода в виде экзометаболитов. Целью данной работы являлось изучение окисления пирротина в тех же условиях. Опыты проводили в колбах со 100 мл среды, содержащей минеральные соли и 0,01 % ДЭ, и 2 г. пирита при 45°C на ротационной качалке (200 об./мин). Продолжительность опыта составила 30 сут. Фиксировали Eh, pH среды и концентрацию железа в жидкой фазе. В экспериментах были использованы штаммы *Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* VKMV 1269^T и *Acidiplasma* sp. MBA-1. Начальная численность клеток штаммов составляла 1×10^7 кл/мл. Для эксперимента использовали различные сочетания штаммов (Рис. 1). Степень окисления пирротина была достаточно высокой в вариантах с *A. caldus* (Рис. 1). Это может объясняться тем, что пирротин окисляется по полисульфидному механизму, в результате чего на его поверхности происходит отложение большого количества элементарной серы, которая препятствует дальнейшему окислению, а *A. caldus*, который является наиболее активным окислителем серы способствовал ее удалению.

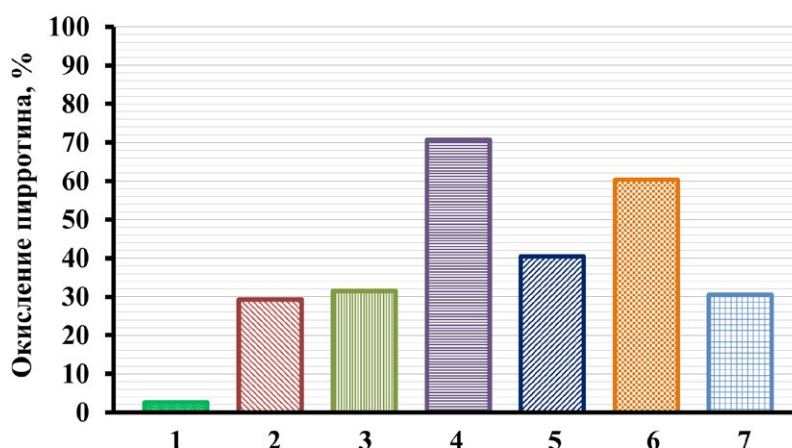


Рис. 1. Степень окисления пирротина в различных вариантах эксперимента (%).

Варианты: 1 – стерильный контроль; 2 - *Sb. thermosulfidooxidans* BKMB 1269T; 3 - *Acidiplasma* sp. MBA-1; 4 - *A. caldus* MBC-1; 5 - *Sb. thermosulfidooxidans* BKMB 1269T + *A. caldus* MBC-1; 6 - *Acidiplasma* sp. MBA-1 + *A. caldus* MBC-1; 7 - *Sb. thermosulfidooxidans* BKMB 1269T + *Acidiplasma* sp. MBA-1

Литература:

1. Лабырич М.В., Булаев А.Г. Окисление пирротина умеренно-термофильными микроорганизмами // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы IX международного конгресса (Москва, 20-22 февр. 2017 г.). – Москва, 2017. – С. 449-451.

UDC 62.99.29

OXIDATION OF PYRRHOTITE BY MODERATELY THERMOPHILIC MICROORGANISMS

Labyrich M.V.^{1,2}, Bulaev A.G.^{1,2}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

119071 Moscow, 33, bld. 2 Leninsky Ave

²Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

119071 Moscow, 1, bld. 12 Leninskiye Gory

e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Data on the rate of pyrrhotite oxidation by various microorganisms, representatives of the groups predominating in the processes of biooxidation are presented. It was shown that the oxidation rates of the mineral by microorganisms differed and largely depended on their ability to oxidize elemental sulfur.

Key words: acidophilic microorganisms; sulfide minerals, pyrrhotite, sulfur

The mechanisms of interaction of acidophilic microorganisms and sulfide minerals are well studied. If the most common sulfide mineral, pyrite, is oxidized via thiosulfate mechanism, where thiosulfate is the main intermediate oxidizing to sulfate, most sulfide minerals are oxidized via polysulfide mechanism, which is characterized by the formation of polysulfides as an intermediate and elemental sulfur. In our previous work, we investigated pyrite oxidation by moderately thermophilic acidophilic microorganisms. [1]. It was shown that iron-oxidizing microorganisms played a key role in pyrite oxidation, while sulfur-oxidizing microorganisms played an indirect role in pyrite biooxidation, supplying mixotrophic iron-oxidizing strains with an organic carbon source in the form of exometabolites. The goal of the present work was to study the oxidation of pyrrhotite under the same conditions. The experiments were performed in flasks with 100 ml of medium containing mineral salts 0.02% of yeast extract and 2 g of pyrite at 45°C on a rotary shaker (200 rpm). The duration of the experiment was 30 days. Values of Eh,

pH of the medium and iron concentration in the liquid phase were measured. Strains *Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* VKMV 1269^T and *Acidiplasma* sp. MBA-1 were used in the experiments. The initial cell number of the strains was 1×10^7 cells/ml. Different combinations of strains were used in the experiment (Fig. 1). The rate of pyrrhotite oxidation was higher in the variants with *A. caldus* (Fig. 1). This can be explained by the fact that pyrrhotite is oxidized via polysulfide mechanism, resulting in precipitation of a large amount of elemental sulfur on its surface, which prevents further oxidation, while *A. caldus*, which is the most active oxidant of sulfur, promoted its removal.

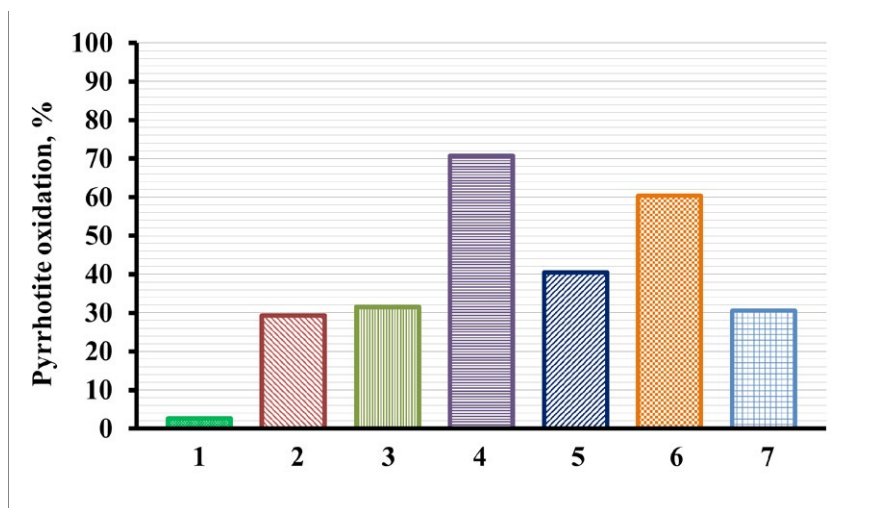


Fig. 1. The rate of pyrrhotite oxidation in different variants of the experiment (%).

Variants: 1 - sterile control ; 2 - *Sb. thermosulfidooxidans* BKMB 1269T; 3 - *Acidiplasma* sp. MBA-1; 4 - *A. caldus* MBC-1; 5 - *Sb. thermosulfidooxidans* BKMB 1269T + *A. caldus* MBC-1; 6 - *Acidiplasma* sp. MBA-1 + *A. caldus* MBC-1; 7 - *Sb. thermosulfidooxidans* BKMB 1269T + *Acidiplasma* sp. MBA-1

References:

1. Labyrich M.V., Bulaev A.G. Oxidation of pyrite by moderately thermophilic microorganisms // *Biotechnology: state of the art and perspectives: proceedings of the IX International Congress (Moscow, February 20-22, 2017)*. – Moscow, 2017. – P. 449-451.

УДК 62.99.29

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НОВЫХ НАПРАВЛЕНИЙ В БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИИ

Булаев А.Г.^{1,2}

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, 2

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Ключевые слова: ацидофильные микроорганизмы, биогидрометаллургия, гетеротрофные микроорганизмы, грибы, метаболиты

В гидрометаллургии на практике используются различные процессы, основанные на активности микроорганизмов, включая технологии биовыщелачивания (биоокисления) сульфидных руд и концентратов ацидофильными микроорганизмами, очистки сточных вод от сульфатов и тяжелых металлов сульфатредуцирующими микроорганизмами, деструкции цианидов и тиоцианатов гетеротрофными и автотрофными микроорганизмами различных групп [1–3]. Закономерности, которые лежат в основе этих процессов и разнообразие микроорганизмов, которые их осуществляют, активно изучаются и достаточно

хорошо известны. При этом в металлургии потенциально могут быть использованы и другие процессы, которые осуществляются микроорганизмами, либо основаны на применении микробных метаболитов [4]. Среди перспективных направлений можно выделить применение грибов для переработки руд и концентратов двойной упорности [5, 6], использование умеренно-ацидофильных прокариот для переработки сульфидных руд [7], применение аминокислот для выщелачивания цветных металлов [8]. При этом развитие новых направлений в биогидрометаллургии требует критической оценки возможности применения тех или иных процессов, осуществляемых микроорганизмами на практике.

Литература:

1. Кондратьева Т.Ф., Булаев А.Г., Муравьев М.И. Микроорганизмы в биогеотехнологиях переработки сульфидных руд. — М.: Наука, 2015 год. — 212 с.
2. Булаев А.Г., Пименов Н.В. Биотехнологии очистки сточных вод цветной металлургии // Биотехнология. — 2015. — № 3. — С. 8-29.
3. Luque-Almagro V.M., Moreno-Vivian C., Roldan M. D. Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries // *Current Opinion in Biotechnology*. — 2016. — V. 38. — P. 9–13.
4. Johnson D.B. Biomining – biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. V. 30. P. 24–31.
5. Ofori-Sarpong G., Osseo-Asare K., Tien M. Mycohydrometallurgy: Biotransformation of double refractory gold ores by the fungus, *Phanerochaete chrysosporium* // *Hydrometallurgy*. — 2013. — V. 137. — P. 38–44.
6. Konadu K.T., Sasaki K., Kaneta T., Ofori-Sarpong G., Osseo-Asare K. Bio-modification of carbonaceous matter in gold ores: Model experiments using powdered activated carbon and cell-free spent medium of *Phanerochaete chrysosporium* // *Hydrometallurgy*. — 2017. — V. 168. — P. 76–83.
7. Mubarak M.Z., Winarko R., Chaerun S.K., Rizki I.N., Ichlas Z.T. Improving gold recovery from refractory gold ores through biooxidation using iron-sulfur-oxidizing/sulfur-oxidizing mixotrophic bacteria // *Hydrometallurgy*. — 2017. — V. 168. — P. 69–75.
8. Eksteen J.J., Oraby E.A., Tanda B.C. A conceptual process for copper extraction from chalcopyrite in alkaline glycinate solutions // *Minerals Engineering*. — 2017. — V. 108. — P. 53-66.

UDC 62.99.29

PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW DIRECTIONS IN BIOHYDROMETALLURGY

Bulaev A.G.^{1,2}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences; Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky Ave, 33, bld. 2

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119234, Moscow, Leninskiye Gory, 1, bld. 12
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Key words: acidophilic microorganisms, biohydrometallurgy, heterotrophic microorganisms, fungi, metabolites

Various processes based on the activity of microorganisms including bioleaching (biooxidation) of sulfide ores and concentrates by acidophilic microorganisms, wastewater treatment for removal sulfates and heavy metals by sulfate-reducing microorganisms, destruction of cyanides and thiocyanates by different heterotrophic and autotrophic microorganisms are used in hydrometallurgy on an industrial scale [1–3]. The patterns of these processes and the diversity of microorganisms that perform these processes are actively studied and relatively well known. At the same time, other processes that are carried out by microorganisms or based on the use of microbial metabolites can potentially be used in metallurgy [4]. Application of fungi for the treatment of double refractory ores and concentrates [5, 6], moderately acidophilic prokaryotes for the processing of sulfide ores [7], and amino acids for leaching non-ferrous metals [8] are among the promising areas. At the same time, the development of new directions in biohydrometallurgy requires a critical assessment of the applicability of certain processes carried out by microorganisms in practice.

References:

1. Kondrat'eva T.F., Bulaev A.G., Muravyov M.I. Microorganisms in biotechnologies of sulfide ores processing. — Moscow: Nauka, 2015. — 212 p.

2. Bulaev A.G., Pimenov N.V. *Biotechnology for Decontamination of Metallurgical Sewages* // *BIOTECHNOLOGY*. — 2015. — № 3. — P. 8-29.
3. Luque-Almagro V.M., Moreno-Vivian C., Roldan M. D. *Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries* // *Current Opinion in Biotechnology*. — 2016. — V. 38. — P. 9–13.
4. Johnson D.B. *Biomining – biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials* // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. V. 30. P. 24–31.
5. Ofori-Sarpong G., Osseo-Asare K., Tien M. *Mycohydrometallurgy: Biotransformation of double refractory gold ores by the fungus, Phanerochaete chrysosporium* // *Hydrometallurgy*. — 2013. — V. 137. — P. 38–44.
6. Konadu K.T., Sasaki K., Kaneta T., Ofori-Sarpong G., Osseo-Asare K. *Bio-modification of carbonaceous matter in gold ores: Model experiments using powdered activated carbon and cell-free spent medium of Phanerochaete chrysosporium* // *Hydrometallurgy*. — 2017. — V. 168. — P. 76–83.
7. Mubarak M.Z., Winarko R., Chaerun S.K., Rizki I.N., Ichlas Z.T. *Improving gold recovery from refractory gold ores through biooxidation using iron-sulfur-oxidizing/sulfur-oxidizing mixotrophic bacteria* // *Hydrometallurgy*. — 2017. — V. 168. — P. 69–75.
8. Eksteen J.J., Oraby E.A., Tanda B.C. *A conceptual process for copper extraction from chalcopyrite in alkaline glycinate solutions* // *Minerals Engineering*. — 2017. — V. 108. — P. 53-66.

УДК 579.22

РОЛЬ ВНЕХРОМОСОМНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В МЕТАЛЛОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФОВ

Панюшкина А.Е.¹, Бабенко В.В.²

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

117312, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

e-mail: zhuravleva-inmi@mail.ru

Идентифицирована и секвенирована интегрированная в хромосому плаزمиды термотолерантной сульфобациллы. Проведено сравнение интегрированной плазмиды с известными плазмидами сульфобацилл и других ацидофильных хемолитотрофов. Показано, что данная плазмиды детерминирует металлоустойчивость и кодирует компоненты электрон-транспортной системы.

Ключевые слова: ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы; сульфобацилла; интегрированная плазмиды; металлорезистентность; ЭТЦ; окисление железа и серы

Благодаря способности к окислению двухвалентного железа, элементной серы, ее восстановленных соединений и сульфидов металлов, ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы (АХМ) представляют практическую значимость для биотехнологий извлечения цветных и благородных металлов. Многие АХМ устойчивы к экстремально высоким концентрациям тяжёлых металлов в среде, что позволяет эффективно использовать АХМ на микробной стадии окисления в процессе чанового и кучного биовыщелачивания. В отличие от большинства других микроорганизмов, для АХМ не характерна локализация детерминант металлоустойчивости на внехромосомных элементах. Металлорезистентность АХМ, как правило, кодируется хромосомой. Более того, большинство плазмид АХМ являются криптическими, не несущими каких-либо свойств или функций, необходимых для жизнедеятельности микроорганизмов. В настоящей работе нами обнаружен участок хромосомы термоацидофильной сульфобациллы, который был идентифицирован как конъюгативная плазмиды, интегрированная в хромосому. Секвенирование и аннотирование плазмидного участка показали, что плазмиды содержит гены, кодирующие компоненты системы металлорезистентности. Плазмиды также кодирует компоненты электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). На основании полученных нами данных в настоящей работе и предыдущих исследованиях можно заключить, что интеграция плазмиды в хромосому произошла относительно недавно, а плазмидная локализация детерминант устойчивости к металлам обусловила конкурентное преимущество данного штамма в микробных сообществах промышленного процесса, из которого он был выделен.

UDC 579.22

THE ROLE OF EXTRACHROMOSOMAL ELEMENTS IN METAL RESISTANCE OF BIOTECHNOLOGICALLY SIGNIFICANT ACIDOPHILIC CHEMOLITHOTROPHS

Panyushkina A. E.¹, Babenko V. V.²

¹Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Winogradsky Institute of Microbiology, Moscow, Russia

²Federal Medical Biological Agency, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia
117312 Leninsky Ave, 33, bld. 2, Moscow, Russia
e-mail: zhuravleva-inmi@mail.ru

A plasmid of the thermotolerant sulfobacillus, integrated into the chromosome, was identified and sequenced. The comparison of the integrated plasmid with known plasmids of sulfobacilli and other acidophilic chemolithotrophs was carried out. This plasmid was shown to determine the metal resistance and to encode the components of the electron-transport system.

Key words: acidophilic chemolithotrophic microorganisms; sulfobacillus; integrated plasmid; metal resistance; ETC; oxidation of iron and sulfur

Due to the ability to oxidize ferrous iron, elemental sulfur, its reduced compounds, and metal sulfides, acidophilic chemolithotrophic microorganisms (ACM) are of practical importance for the biotechnology of the extraction of non-ferrous and noble metals. Many ACM are resistant to extremely high concentrations of heavy metals in the medium, which makes it possible to use ACM efficiently at the microbial stage of oxidation in the tank and heap bioleaching processes. In contrast to the majority of microorganisms, localization of metal resistance determinants on extrachromosomal elements is unusual for ACM. As a rule, metal resistance of ACM is encoded by the chromosome. Moreover, most plasmids of ACM are cryptic and determine no features or functions, essential for microorganisms. In the present work, we have revealed a region of the chromosome in the thermoacidophilic sulfobacillus, which was identified as an integrated conjugative plasmid. Sequencing and annotation of the plasmid region indicated that the plasmid contained the genes encoding the components of systems of heavy metal resistance. The plasmid also encoded the components of the electron transport chain (ETC). Based on our findings in the present work and previous studies, we suggest that integration of the plasmid into the chromosome occurred relatively recently, and the plasmid localization of the metal resistance determinants gave a competitive advantage to this strain in the microbial communities of the industrial process, from which it was isolated.

УДК 669.2:579.6

СЕРООКИСЛЯЮЩАЯ И ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ОКИСЛЯЮЩИХ ПИРИТНЫЙ И ПИРРОТИНОВЫЙ ФЛОТОКОНЦЕНТРАТЫ

Рукоусева Г.А., Белый А.В.

Акционерное общество «Полюс Красноярск», ул. Цимлянская, д. 37,
г. Красноярск, Россия, 660061.
e-mail: RukosuevaGA@polyus.com

Изучена серо- и железоокисляющая активность ассоциации микроорганизмов окисляющих пиритный и пирротинный концентрат в условиях разных температур и плотностей пульпы

Ключевые слова: микроорганизмы, биоокисление, флотоконцентрат, извлечение, серо- и железоокисляющая активность, биомасса.

Проведены исследования серо- и железоокисляющей активности ассоциации микроорганизмов, окисляющей пиритный и пирротинный флотоконцентраты, при плотности пульпы 100, 150, 200 г/л и температуре процесса 30°C, 35°C, 40°C.

Определяли соотношение концентрации биомассы железо- и сероокисляющих микроорганизмов в жидкой и твердой фазе пульпы, их влияние на степень окисления сульфидных минералов и степень извлечения золота.

Сульфиды, представленные пиритом, окислились более быстро и полно ассоциацией микроорганизмов при температуре процесса 35°C с плотностью пульпы 150 г/л, при этом концентрация клеток микроорганизмов достигала 3 г/л. В этих условиях соотношение концентрации биомассы железо- и сероокисляющих микроорганизмов составило 3:1. Были получены следующие данные по степени окисления сульфидных элементов: As s – 95,65%, Ss – 96,10%, Sb s – 19,90%, Fe s – 95,98%. Извлечение золота достигло – 98,09%.

В процессе биоокисления пирротинового флотоконцентрата с температурой процесса 35°C и плотностью пульпы 150 г/л биомасса и дыхательная активность серо- и железоокисляющих микроорганизмов в жидкой и твердой фазе пульпы была максимальной. Концентрация биомассы микроорганизмов в жидкой фазе пульпы составила 2,5 г/л. Соотношение концентрации биомассы железо- и сероокисляющих микроорганизмов в этих условиях – 4:1. Получены следующие данные по степени окисления сульфидных элементов: As s – 94,44%, Ss – 98,94%, Sb s – 32,00%, Fe s – 98,08%. Извлечение золота достигло – 98,20%.

При температуре окисления пирротинового концентрата 40°C, концентрация биомассы микроорганизмов была максимальной в жидкой фазе пульпы с плотностью 150 г/л – 4,5 г/л. Концентрации клеток на твердой фазе не обнаружено. В ассоциации микроорганизмов при плотности пульпы от 100 до 150 г/л, доминировали сероокисляющие микроорганизмы, соотношение концентрации биомассы серо- и железоокисляющих микроорганизмов составило 3:1. Поскольку в процессе окисления концентрата, преобладали сероокисляющие микроорганизмы, расход серной кислоты снизился. Степень окисления сульфидных элементов составила: As s – 89,28%, Ss – 99,90%, Sb s – 32,00%, Fe s – 99,50%. Извлечение золота достигло – 98,2%.

Следует отметить, что при температуре окисления 30°C, происходит максимальное окисление сульфидов сурьмы как пиритного, так и пирротинового флотоконцентратов. Максимальная степень окисления сурьмы, в процессе биоокисления сульфидов представленных пиритом, получено при плотности пульпы 200 г/л, и составила 94,93%. В процессе биоокисления пирротинового флотоконцентрата, максимальная степень окисления сульфидов сурьмы получена из кека при плотности пульпы 100 и 200 г/л, где составила 57,60%.

Исследования соотношения биомассы серо- и железоокисляющих микроорганизмов, их активности, в зависимости от температуры процесса и плотности пульпы, позволяют контролировать и управлять процессом биоокисления, ориентируясь на преобладающие сульфиды во флотоконцентрате.

UDC 669.2:579.6

SULFUR- AND IRON-OXIDATING ACTIVITY OF THE ASSOCIATION OF MICROORGANISMS OF OXIDIZING PYRITAL AND PYRROTINO FLOTO CONCENTRATES

Rukosueva G.A., Belyi A.V.

JSC «Polyus Krasnoyarsk», 37 Tsymlyanskaya Str.,
 Krasnoyarsk, Russia 660061
 e-mail: RukosuevaGA@polyus.com

The sulfur and iron-oxidizing activity of the association of microorganisms oxidizing pyrite and pyrrhotite concentrate was studied under conditions of different temperatures and pulp densities.

Key words: microorganisms, bio-oxidation, flotation concentrate, extraction, sulfur and iron-oxidizing activity, biomass

Studies of the sulfur and iron-oxidizing activity of the association of microorganisms oxidizing pyrite and pyrrhotite flotation concentrates were carried out at a pulp density of 100, 150, 200 g / l and a process temperature of 30°C, 35°C, 40°C.

The ratio of the biomass concentration of iron and sulfur-oxidizing microorganisms in the liquid and solid pulp phases, their influence on the oxidation state of sulfide minerals, and gold recovery was determined.

Sulfides, represented by pyrite, were oxidized more quickly and completely by the association of microorganisms

at a process temperature of 35°C with a pulp density of 150 g / l, while the cell concentration of microorganisms reached 3 g / l. Under these conditions, the ratio of the biomass concentration of iron and sulfur-oxidizing microorganisms was 3: 1. The following data were obtained on the degree of oxidation of sulfide elements: As s – 95,65%, Ss – 96,1%, Sb s – 19,9%, Fe s – 95,98%. Gold was reach – 98,09%.

In the process of biooxidation of the pyrrhotite flotation concentrate with a process temperature of 35°C and a pulp density of 150 g / l biomass and respiratory activity of sulfur and iron oxidizing microorganisms in the liquid and solid pulp phase was maximum. The concentration of biomass of microorganisms in the liquid phase of the pulp was 2,5 g / l. The ratio of the biomass concentration of iron and sulfo-oxidizing micro-ovages under these conditions is 4:1. The following data were obtained on the degree of oxidation of sulfide elements: As s – 94,44%, Ss – 98,94%, Sb s - 32%, Fe s – 98,08%. Gold was reach – 98,2%.

At a temperature of oxidation of pyrrhotite concentrate of 40°C, the biomass concentration of microorganisms was maximum in the liquid phase of the pulp with a density of 150 g / l - 4.5 g / l. The concentration of cells on the solid phase was not detected. In the association of microorganisms at a density of 100 to 150 g / l, sulfur-oxidizing microorganisms dominated, the ratio of biomass concentration of sulfur-and iron-oxidizing microorganisms was 3:1. Since the sulfur-oxidizing microorganisms prevailed during the oxidation of the concentrate, the consumption of sulfuric acid was decreased. The oxidation state of sulfide elements was: As s – 89,28%, Ss – 99,90%, Sb s – 3,00%, Fe s – 99,50%. Gold was reach – 98,2%.

It should be noted that at the oxidation temperature of 30 ° C, the maximum oxidation of antimony sulfides of both pyrite and pyrrhotite flotation concentrates occurs. The maximum degree of oxidation of antimony, in the process of biooxidation of sulfides represented by pyrite, was obtained at a pulp density of 200 g / l and was 94,93%. In the process of biooxidation of the pyrrhotite flotation concentrate, the maximum oxidation state of antimony sulfides was obtained from a cake with a pulp density of 100 and 200 g / l, where it was 57,6%.

Studies of the ratio of the biomass of sulfur and iron-oxidizing microorganisms, their activity, depending on the process temperature and pulp density, allow to manage and control the process of biooxidation, focusing on the prevalence of sulfides in the flotation concentrate.

БИОКАТАЛИЗ И БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

BIOCATALYSIS AND TECHNOLOGIES

1. БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ГРИБНЫХ КСИЛАНАЗ, Денисенко Ю.А., Волков П.В., Доценко А.С.	459
PROTEIN ENGINEERING OF FUNGAL XYLANASES, Denisenko Y.A., Volkov P.V., Dotsenko A.S.	461
2. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В ОРМОСИЛ МИКРООРГАНИЗМОВ, Д.Г.Лаврова, О.А.Каманина, О.Н.Понаморева.....	462
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MICROORGANISMS ENCAPSULATED IN ORMOSIL SHELLS, D.Lavrova, O.Kamanina, O.Ponamoreva.....	463
3. ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА НА ВЫХОД БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ, О.В.Байбакова, Е.К.Гладышева.....	464
PRETREATMENT EFFECT OF MISCANTHUS ON BACTERIAL NANOCELLULOSE YIELD, O.Baibakova, E. Gladysheva	465
4. ИММОБИЛИЗОВАННАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ЛИПАЗА КАК БИОКАТАЛИЗАТОР НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СИНТЕЗА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ, П.В.Нуруллина.....	466
IMMOBILIZED RECOMBINANT LIPASE AS A BIOCATALYST OF LOW-TEMPERATURE SYNTHESIS OF ETHERS, P.Nurullina.....	467
5. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ОБОЛОЧЕК НА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦАХ, Сотников Д.В., Иванов В.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.	468
STUDY OF MECHANISMS OF PROTEIN SHELLS FORMATION ON GOLD NANOPARTICLES, Sotnikov D.V., Ivanov V.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.	469
6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ, Нечаева Н. Л., Богинская И. А., Курочкин И. Н.....	470
QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYCATED ALBUMIN BY SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY, Nechaeva N. L., Boginskaya I. A., Kurochkin I. N.	470
7. КОЭКСПРЕССИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS С ТРИГГЕРНЫМ ФАКТОРОМ ПСИХРОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ DEVOSIA PSYCHROPHILA И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЕ СВОЙСТВ, Сорокина К.Н., Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Пармон В.Н.	471
CO-EXPRESSION OF THERMOSTABLE ESTERASE FROM UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS WITH TRIGGER FACTOR OF DEVOSIA PSYCHROPHILA AND STUDY OF ITS PROPERTIES, Sorokina K.N., Samoylova Yu.V., Piligaev A.V., Parmon V.N.	472
8. ЛАККАЗА-КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ СИНТЕЗ ПОЛИ(3,4-ЭТИЛЕНДИОКСИТИОФЕНА) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИСТИРОЛСУЛЬФОНАТА НАТРИЯ И МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК, Васильева И.С., Шумакович Г.П., Морозова О.В., Хлупова М.Е., Васильев Р.Б., Зайцева Е.А., Ярополов А.И.	472
LACCASE-CATALYZED SYNTHESIS OF POLY(3,4-ETHYLENEDIOXYTHIOPHENE) IN COMBINATION WITH SODIUM POLYSTYRENE SULFONATE AND MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES, Vasil'eva I.S., Shumakovich G.P., Morozova O.V., Khlopova M.E., Vasil'ev R.B., Zaitseva E.A., Yarpolov A.I.	474
9. МАСШТАБИРОВАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ, Г.Ф.Миронова.	475
SCALE-UP OF REPEATED-BATCH BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL NANOCELLULOSE, G.Mironova	476
10. ОПТИМАЛЬНАЯ СИСТЕМА МНОГОСТУПЕНЧАТОЙ БИОКОНВЕРСИИ ОТХОДОВ И СЫРЬЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, Понкратов А.С., Валеева Р.Т., Нуртдинов Р.М., Понкратова С.А., Шулаев М.В.....	477
OPTIMAL SYSTEM OF MULTI-STEPS BIOCONVERSION OF WASTE AND RAW MATERIALS, Ponkratova A.S., Valeeva R.T., Nurtdinov R.M., Ponkratova S.A., Shulaev M.V.....	478
11. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ, НАГРУЖЕННЫХ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗОЙ, Ходак Е.М., Щербаклова В.К., Красноштанова А.А.	479
OBTAINING CALCIUM CARBONATE MICROPARTICLES LOADED BY PANCREATIC LIPASE, Khodak E.M., Shcherbakova V.K., Krasnoshtanova A.A.....	480
12. РАЗЛИЧНЫЕ ТОКСИНЫ КАК ФЕРМЕНТНЫЕ СУБСТРАТЫ, Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Ахундов Р.Ф., Асланлы А.Г., Степанов Н.А., Сенько О.В., Маслова О.В., Махлис Т.А.....	481
DIFFERENT TOXINS AS ENZYMATIC SUBSTRATES, Efremenko E.N., Lyagin I.V., Ahundov R.F., Aslanli A.G., Stepanov N.A., Senko O.V., Maslova O.V., Makhlis T.A.	482

13. РАЦИОНАЛЬНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ (НАНОКОМПОЗИТНЫХ) ПОЛИМЕРНЫХ ПОКРЫТИЙ ДЛЯ БИОСЕНСОРНЫХ ПРИМЕНЕНИЙ, Сиголаева Л.В., Шумянцева В.В., Курочкин И.Н., Ян Дж., Пергушов Д.В., Шахер Ф.Х.	482
RATIONAL DESIGN OF (NANOCOMPOSITE) POLYMERIC COATINGS FOR BIOSENSING APPLICATIONS, Sigolaeva L.V., Shumyantseva V.V., Kurochkin I.N., Yuan J., Pergushov D.V., Schacher F.H.	483
14. СОВРЕМЕННЫЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОМПОЗИТНЫХ ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ, Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Кузнецов В.Л., Беклемишев А.Б.	484
NANOSTRUCTURED CARBON MATERIALS FOR PREPARING COMPOSITE HETEROGENEOUS BIOCATALYSTS, Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B., Kuznetsov V.L.	485
15. СОЗДАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА PENICILLIUM VERRUCULOSUM ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ, Шашков И.А., Синицын А.П., Сатрутдинов А.Д.	486
CREATION OF ENZYME PREPARATIONS OF THE NEW GENERATION ON THE BASIS OF THE MICELIAL MUSHROOM PENICILLIUM VERRUCULOSUM FOR APPLICATION IN FOOD PRODUCTION, Shashkov I.A., Sinitsyn A.P., Satrutdinov A.D.	487
16. СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ФОРМЫ ГЕКСАГИСТИДИНСОДЕРЖАЩЕЙ ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗЫ (HIS6-OPH) СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ, Асланли А.Г., Маслова О.В., Лягин И.В., Сенько О.В., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н.	488
STABILIZED FORMS OF HEXAHISTIDINE CONTAINING ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE (HIS6-OPH) WITH SPECIFIC PROPERTIES, Aslanli A.G., Maslova O.V., Lyagin I.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Efremenko E.N.	489
17. СУПЕРКОМПЬЮТЕРНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛОЖНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ КАТАЛИЗА И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ХОЛИНЭСТЕРАЗ, Лушчекина С.В., Массон П., Махаева Г.Ф., Петров К.А., Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Варфоломеев С.Д.	490
SUPERCOMPUTER MOLECULAR MODELING FOR RESEARCH ON COMPLEX CATALYTIC REACTIONS AND PHARMACOLOGICAL PROBLEMS OF CHOLINESTERASES, Lushchekina S.V., Masson P., Makhaeva G.F., Petrov K.A., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Varfolomeev S.D.	490
18. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФОРМИРОВАНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ ДИМЕРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ, Новичкова Д. А., Лушчекина С. В., Немухин А.В.	491
PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS DETERMINING THE FORMATION AND STABILITY OF CHOLINESTERASE DIMERS, Novichkova D. A., Lushchekina S. V., Nemukhin A.V.	492

УДК 577.15
УДК 602.3:579.8

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ГРИБНЫХ КСИЛАЗ

Денисенко Ю.А., Волков П.В., Доценко А.С.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.
e-mail: denisenkoyura@mail.ru

Методами белковой инженерии проведен ряд аминокислотных замен в трех эндо-1,4-β-ксилазах из 10-ой семьи гликозидгидролаз. Получены мутантные формы ксиланаз, которые обладают улучшенной температурной стабильностью, и формы, устойчивые к белковым ингибиторам Xylanase Inhibiting Protein из злаковых растений.

Ключевые слова: ксиланазы, сайт-направленный мутагенез, термостабильность, ингибиторы XIP

Ксиланы являются основными нецеллюлозными полисахаридами во многих древесных породах, злаках, льне и других растениях. Ксиланы составляют до 30% клеточной стенки растений и относятся к числу наиболее распространенных полисахаридов на Земле. Эндо-1,4-β-ксилазы (или просто ксиланазы) и ксиланолитическая система ферментов в целом участвуют в биodeградации ксиланов. На данный

момент можно выделить ряд областей, в которых ксиланазы играют ключевую роль: биоотбеливание целлюлозы, производство соков и вин, переработка сельскохозяйственных отходов, производство ксилита и биоэтанола. Основным направлением использования ксиланазных ферментных препаратов является кормовая промышленность, где ксиланазы используются в качестве добавки к комбикормам. Использование ксиланаз в качестве биокатализаторов в технологических процессах накладывает на ферменты определенные требования, такие как высокая каталитическая активность и термостабильность, возможность применения при определенных значениях pH, устойчивость к ингибиторам и т.д.

Целями данной работы являлось увеличение температурной стабильности трех грибных ксиланаз из 10-ой семьи гликозидгидролаз: ксиланаз А и Е *Penicillium canescens*, ксиланазы III *Trichoderma reesei*, а также получение мутантных форм ксиланазы А и ксиланазы III, которые обладают резистентностью к белковым ингибиторам Xylanase Inhibiting Protein (XIP) из злаков. После проведения выравнивания аминокислотных последовательностей ксиланаз и компьютерного моделирования был выбран ряд проводимых аминокислотных замен. Методом гнездового ПЦР были получены мутированные гены ксиланаз. Затем были получены шаттл-векторы, несущие мутированные гены ксиланаз, и была произведена их трансформация в лабораторные штаммы-реципиенты. После проведения культивирования штаммов-реципиентов мутантные формы ксиланаз были выделены в гомогенном виде методами белковой хроматографии и изучены.

Увеличения температурной стабильности ксиланазы Е планировали добиться за счет создания дополнительных ионных взаимодействий и увеличения жесткости третичной структуры белковой глобулы. Изучение температуры плавления гомогенных рекомбинантных форм методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) показало, что 3 аминокислотные замены привели к увеличению температуры плавления на 0,2; 2,3 и 2,7° С. На основании изучения температур плавления методом ДСК можно сделать вывод, что создание дополнительных ионных взаимодействий в белковой глобуле приводит к значительному увеличению температурной стабильности ксиланазы Е.

Увеличения температурной стабильности ксиланазы А планировали добиться за счет создания новых ионных взаимодействий и за счет оптимизации гидрофобных взаимодействий в гидрофобном ядре белковой глобулы. В результате, была получена мутантная форма, которая обладала на 3,9° С более высокой температурой плавления по сравнению с рекомбинантной формой дикого типа. На основании изучения температур фазового перехода можно сделать вывод, что заполнение полости в гидрофобном ядре объемным неполярным аминокислотным остатком фенилаланина привело к оптимизации гидрофобных взаимодействий, и, как следствие, к значительному увеличению термостабильности ксиланазы А.

С помощью разработанного ранее в нашей лаборатории метода было показано, что ксиланазы А и ксиланазы III подвергаются ингибированию XIP-подобными белками из злаков, в то время как ксиланазы Е демонстрирует устойчивость к данному типу ингибиторов. С помощью проведения аминокислотного выравнивания и совмещения кристаллических структур ксиланаз было показано, что дополнительная вставка из 5 аминокислот в ксиланазу Е приводит к удлинению стенки ущелья, образующей активный центр ксиланазы Е, а также создает стерические затруднения для связывания ингибитора с ферментом. Дополнительная вставка из 5 аминокислот была введена в ксиланазу А и ксиланазу III в соответствующих положениях. Исследования свойств мутантных форм ксиланаз со вставками показало, что они демонстрируют устойчивость к белковым ингибиторам типа XIP из злаковых растений.

Таким образом, были получены мутантные формы ксиланазы А и ксиланазы Е, которые обладают более высокой термостабильностью и получены мутантные формы ксиланазы А и ксиланазы III, которые обладают свойством резистентности к белковым ингибиторам типа XIP из злаков.

Государственное задание: «Разработка новых ферментных комплексов для промышленной биотехнологии и сельского хозяйства на основе грибных систем экспрессии с применением методов генетической инженерии и рационального белкового дизайна ферментативных систем».

UDC 577.15
UDC 602.3:579.8

PROTEIN ENGINEERING OF FUNGAL XYLANASES

Denisenko Y.A., Volkov P.V., Dotsenko A.S.

The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Russian Federation, Moscow, Leninsky Prospect, 33, Building 2.
e-mail: denisenkoyura@mail.ru

Protein engineering has carried out a series of amino acid substitutions in three endo-1,4- β -xylanases of the 10th family of glycoside hydrolases. Mutant forms of xylanases that have improved temperature stability and forms that have resistance to Xylanase Inhibiting Protein inhibitors from cereals have been obtained.

Key words: xylanases, site-directed mutagenesis, thermal stability, XIP inhibitors

Xylans are the main non-cellulose polysaccharides in many tree species, cereals, flax and other plants. Xylans make up 30% of the plant cell wall and are among the most common polysaccharides on Earth. Endo-1,4- β -xylanase (or simply xylanase) and xylanolytic system of enzymes in generally are involved in the biodegradation of xylans. Currently, a number of areas in which xylanases play a key role can be distinguished: bio-bleaching of cellulose, production of juices and wines, processing of agricultural waste, production of xylitol and bioethanol. The main direction of use of xylanase enzyme preparations is the feed industry, where xylanases are used as an additive to compound feed. The use of xylanases as biocatalysts in technological processes imposes certain requirements on enzymes, such as high catalytic activity and thermal stability, the possibility of using at certain pH values, resistance to inhibitors, etc.

The objectives of this work were to increase the temperature stability of three fungal xylanases from the 10th glycoside hydrolase family: *Penicillium canescens* xylanases A and E, *Trichoderma reesei* xylanase III, as well as obtaining mutant forms of xylanase A and xylanase III that are resistant to Xylanase Inhibiting Protein (XIP) from cereals. After carrying out the alignment of xylanase amino acid sequences and computer modeling, a number of amino acid substitutions were selected. Mutated xylanase genes were obtained by nested PCR. Shuttle vectors carrying mutated xylanase genes were obtained, and transformed into laboratory recipient strains. After the cultivation of recipient strains, mutant xylanase forms were isolated homogeneously by protein chromatography methods and studied.

The increase in temperature stability of xylanase E was planned to be achieved by creating additional ionic interactions and increasing the rigidity of the tertiary structure of the protein globule. The study of the melting temperature of homogeneous recombinant forms by the method of differential scanning microcalorimetry (DSC) showed that 3 amino acid substitutions led to an increase in the melting temperature by 0.2; 2.3 and 2.7° C. Based on the study of the melting temperature of the DSC method, we can conclude that the creation of additional ionic interactions in the protein globule leads to a significant increase in the temperature stability of xylanase E.

Increasing the temperature stability of xylanase A was planned to be achieved by creating new ionic interactions and by optimizing the hydrophobic interactions in the hydrophobic core of the protein globule. As a result, the mutant form with a higher melting point by 3.9° C compared to the wild-type recombinant form was obtained. Based on the study of the phase transition temperature and temperature inactivation, it can be concluded that filling the cavity in the hydrophobic core with a non-polar amino acid residue of phenylalanine led to the optimization of hydrophobic interactions, and, as a result, to a significant increase in the thermal stability of xylanase A.

Using the method developed earlier in our laboratory, it was shown that xylanase A and xylanase III are inhibited by XIP-like cereal proteins, while xylanase E shows resistance to this type of inhibitors. Based on the amino acid alignment and alignment of xylanase crystal structures, it was shown that an additional 5 amino acid insert in xylanase E leads to a lengthening of the gorge wall, forming the active center of xylanase E, and also creates steric difficulties for binding the inhibitor to the enzyme. Additional inserts of 5 amino acids were introduced into xylanase A and xylanase III in the respective positions. Studies of the properties of mutant forms of xylanases with inserts have shown that they demonstrate resistance to protein inhibitors XIP from cereals.

Thus, mutant forms of xylanase A and xylanase E, which have a higher thermal stability, and mutant forms of xylanase A and xylanase III, which have the property of resistance to protein inhibitors of XIP from cereals, were obtained.

State task: "Development of new enzyme complexes for industrial biotechnology and agriculture based on fungal expression systems using genetic engineering methods and rational protein design enzyme systems".

УДК: 579.6:695:663

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В ОРМОСИЛ МИКРООРГАНИЗМОВ

Д.Г.Лаврова, О.А.Каманина, О.Н.Понаморева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», Россия, 300012, Тула, пр.Ленина, 92,
e-mail: d.g.fedoseeva@gmail.com

Гибридные материалы синтезированы путем инкапсулирования клеток микроорганизмов с помощью золь-гель химии кремния. На основе полученных материалов разработаны перспективные биокатализаторы для применения в биотехнологии.

Ключевые слова: Инкапсулированные микроорганизмы, ормосил, «клетка в ормосил оболочке», гибридные материалы, золь-гель, кремнийорганические соединения, полиэтиленгликоль

Живые клетки можно рассматривать как эффективные биокатализаторы, но при этом достаточно хрупкие биокатализаторы. Вокруг живых клеток можно сформировать органосиликатные (ормосил) защитные оболочки с использованием кремнийорганических соединений в качестве прекурсоров в условиях золь-гель синтеза. В ормосил материалах I класса органические молекулы (такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт и др.) физически встроены в кремневую сетку и играют основную роль в формировании структуры матрицы на основе кремнезема. Добавление ПЭГ может привести к улучшению биосовместимости, например, путем улучшения поверхностных взаимодействий между кремневой матрицей и живой клеткой или защита клеток от стрессов инкапсуляции.

В работе синтезировали биогибридные материалы на основе инкапсулированных в ормосил дрожжевых клеток в процессе одностадийного золь-гель синтеза (pH 7,6) из тетраэтоксисилана (ТЭОС), метилтриэтоксисилана (МТЭС) и полиэтиленгликоля (ПЭГ) с различными молярными массами в качестве структуроуправляющего агента. Структуру полученных биогибридных материалов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Дыхательная активность инкапсулированных дрожжей была исследована с использованием биосенсора на основе кислородного электрода типа Кларка с инкапсулированными в ормосил клетками дрожжей на его поверхности.

Показано, что ПЭГ в зависимости от молекулярной массы приводит к формированию различных структур конечных биогибридов. Определены условия формирования ормосил оболочек вокруг дрожжевых клеток. [1] Выявлены защитные функции образующейся капсулы по отношению к ионам тяжелых металлов, УФ-излучению и экстремальным значениям pH. В работе продемонстрированы возможности использования новых гибридных материалов в качестве биокатализаторов (биофильтров) и биочувствительных поверхностей (биосенсоров) [2-3].

Работа выполнена при поддержке РФФИ и Правительства Тульской области (проект № 16-43- 710183 p_a).

Литература:

1. Lavrova D. G., Kamanina O. A., Machulin A. V. и др. Effect of polyethylene glycol additives on structure, stability, and biocatalytic activity of ormosil sol-gel encapsulated yeast cells // *J Sol-Gel Sci Technol* – 2017
2. Лаврова Д.Г., Каманина О.А., Арляпов В.А. и др. Биосенсор на основе иммобилизованных в модифицированные силикагели метилотрофных дрожжей для мониторинга процесса брожения // *Журнал «Вестник биотехнологии и физикохимической биологии им. Овчинникова»* - Т.13 (4) – 2017
3. Lavrova D.G., Ponomareva 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. Т. 92. p. 94–98.

UDC: 579.6:695:663

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MICROORGANISMS ENCAPSULATED IN ORMOSIL SHELLS

D.Lavrova, O.Kamanina, O.Ponamoreva

Tula state university, Russia, 300012, Tula, Pr. Lenina , 92
e-mail: d.g.fedoseeva@gmail.com

Hybrid materials were synthesized by encapsulation cells from silica sol-gel chemistry. Perspective biocatalysts based on the materials have been developed for application in biotechnology.

Key words: Encapsulated microorganisms, ormosil, «cell in ormosil shell», hybrid materials, sol–gel, organosilane compounds, polyethylene glycol

Living cells can be considered as highly efficient biocatalysts, but fragile biocatalysts. Organosilicate (Ormorsil) protective shells can be formed around living cells using organosilicon compounds as precursors under sol-gel synthesis conditions. In the ormosil materials of class I, organic molecules (such as PEG, PVA, et al) are physically embedded in a silica network and play a primary role in forming the structure of the silica-based matrix. Additives of PEG may improve biocompatibility by, e.g. improving the surface interactions between sol-gel matrix and living cell or protecting the cells from stresses of encapsulation.

Biohybrid materials based on ormosil encapsulated yeast cells were synthesized through a one-step sol-gel route (pH 7.6) using tetraethoxysilane (TEOS) and methyltriethoxysilane (MTES) and polyethylene-glycol (PEG) with different molar weights as a structure-controlling agent. Scanning electron microscopy (SEM) was employed to evidence possible structures of the materials. The respiration activity of the encapsulated yeast was investigated by a biosensor which was based on the Clark-type oxygen electrode with ormosil encapsulated yeast cells on its surface.

PEG additive during cell encapsulation has induced structural changes within the biohybrids, which depend on PEG molecular weights [1]. The conditions for the formation of ormosil shells around yeast cells were determined. The ORMOSIL shell protects yeast cells from exposure to heavy metal ions, osmotic pressure, UV radiation, acid. The study demonstrated the possibility the use of new hybrid biomaterials as biocatalysts (biofilters) and biosensitive surfaces (biosensors) [2,3].

The reported study was funded by the Russian Foundation for Basic Research and Tula Region Government according to the research project № 16-43-710183.

References:

1. Lavrova D. G., Kamanina O. A., Machulin A. V. et al. Effect of polyethylene glycol additives on structure, stability, and biocatalytic activity of ormosil sol-gel encapsulated yeast cells // *J Sol-Gel Sci Technol* – 2017
2. Lavrova D. G., Kamanina O. A., Arlyapov V.A. et al. Biosensor based on methylotrophic yeast immobilized into modified silica gels to monitor the fermentation process // *Yu. A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*- V.13 (4) – 2017
3. 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.

УДК: 579.66 : 663.1 : 577.32

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА НА ВЫХОД БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

О.В.Байбакова, Е.К.Гладышева

Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской Академии наук (ИПХЭТ СО РАН), Россия, 659322, Бийск, Социалистическая, 1
e-mail: olga_baibakova@mail.ru

Используя химическую модификацию мискантуса получены технические целлюлозы двух видов. Проведено их осахаривание с получением ферментативных гидролизатов, преимущественно глюкозных. Показана возможность биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на средах из мискантуса.

Ключевые слова: мискантус, химическая модификация, осахаривание, *Medusomyces gisevii* Sa-12, бактериальная наноцеллюлоза

В настоящее время проявляется высокий интерес к вопросу снижения стоимости бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ) путем замены дорогостоящих синтетических питательных сред на дешевые среды из нетрадиционных источников сырья [1]. Данный подход является хорошей альтернативой, поскольку при получении БНЦ стоимость синтетической среды может достигать до 65 % от общей стоимости процесса [2]. Перспективным источником сырья для получения БНЦ является энергетическое растение – мискантус. Это высокопродуктивное, быстрорастущее растение, которое может успешно выращиваться по всей территории страны, включая континентальную Сибирь.

Мискантус подвергался химической модификации с получением технических целлюлоз: азотнокислым (ТЦ АС) [3] и комбинированным (ТЦ КС) [3] способами.

Осахаривание ТЦ АС и ТЦ КС проводилось при начальной концентрации субстрата 40 г/л. Ферментативные гидролизаты были отфильтрованы и разбавлены до концентрации глюкозы – от 20 до 25 г/л, для достижения большего выхода БНЦ. После этого в них вносили навеску сухого черного байхового чая (10 г/л) и проводили экстракцию при 100 °С в течение 1 мин, далее охлаждали и фильтровали. На полученных средах проводили биосинтез БНЦ. В качестве продуцента использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* Sa-12 [4]. Продолжительность культивирования составила 14 суток, после гелевой пленки БНЦ отделяли от культуральной среды и промывали [4].

На стадии осахаривания наибольшая концентрация редуцирующих веществ достигнута для ТЦ КС – концентрация составила (40,5±0,2) г/л (выход РВ от массы субстрата – (90,9±0,2) %). При осахаривании ТЦ АС, концентрация РВ снизилась на (8,8±0,1) г/л и составила (31,7±0,2) г/л (выход РВ от массы субстрата составил (71,2±0,2) %). Таким образом, показана возможность получения питательных сред для биосинтеза БНЦ осахариванием технических целлюлоз из мискантуса. Установлено, что способ получения технических целлюлоз не оказывает существенного влияния на выход БНЦ – в зависимости от способа химической модификации мискантуса выход изменяется от 5 % до 6 %. Это свидетельствует о возможности биосинтеза БНЦ на питательных средах, полученных из мискантуса продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12.

Показана возможность получения питательных сред для биосинтеза БНЦ осахариванием технических целлюлоз из мискантуса. Установлено, что способ получения технических целлюлоз не оказывает существенного влияния на выход БНЦ – в зависимости от способа химической модификации мискантуса выход изменяется от 5 % до 6 %. Это свидетельствует о возможности биосинтеза БНЦ на питательных средах, полученных из мискантуса продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Литература:

1. Singh O., Panesar P.S., Chopra H.K. Response surface optimization for cellulose production from agro industrial waste by using new bacterial isolate C18 // *Food Sci. Biotechnol.* 2017. Vol. 26. № 4. P. 1019-1028.
2. Jozala A.F., Pértile R.A.N., Santos C.A., Carvalho Santos-Ebinuma V., Seckler M.M., Gama F.M., Pessoa Jr.A. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99. P. 1181-1190.
3. Budaeva V. V., Makarova E. I., Gismatulina Y. A. Integrated Flowsheet for Conversion of Non-woody Biomass into Polyfunctional Materials // *Key Eng. Mater.* 2016. Vol. 670. P. 202–206.
4. Yurkevich D.I. and Kutysenko V.P. *Medusomycete (Tea Fungus): Research History, Composition, Physiological and Metabolic Peculiarities* // *Biophysics.* 2002. Vol. 47. № 6. P.1116-1129.

UDC: 579.66 : 663.1 : 577.32

PRETREATMENT EFFECT OF MISCANTHUS ON BACTERIAL NANOCELLULOSE YIELD

O.Baibakova, E. Gladysheva

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

Two types of pulps were obtained by chemical modifications of Miscanthus. The pulps were saccharified to furnish enzymatic hydrolyzates, mainly glucose ones. The possibility was demonstrated for the biosynthesis of bacterial nanocellulose in nutrient broths derived from Miscanthus.

Key words: Miscanthus, chemical modification, saccharification, *Medusomyces gisevii* Sa-12, bacterial nanocellulose

There is currently an increased interest towards cutting down the cost of bacterial nanocellulose (BNC) by replacing expensive synthetic nutrient media by cheap ones from unconventional feedstocks [1]. This strategy is a good alternative because the cost of a synthetic medium during the synthesis of BNC may reach as high as 65% of the total process cost [2]. An energy plant Miscanthus is a promising feedstock for the synthesis of BNC. It is a high-yielding, fast-growing grass that can successfully be grown all over the country, including continental Siberia.

Miscanthus was subjected to two chemical modifications to afford pulps: nitric-acid method (NAM pulp) [3] and combined method (CM pulp) [3].

NAM pulp and CM pulp were saccharified at an initial solid loading of 40 g/L. Enzymatic hydrolyzates were filtered off and diluted to a glucose concentration ranging from 20 to 25 g/L, to achieve a higher yield of BNC. Afterwards, to the hydrolyzates was added a weighed portion of black bohea tea (10 g/L), and extraction was performed for 1 min at 100 °C followed by cooling and filtration. The resultant broths were used for the synthesis of BNC. The *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiont was utilized as the bacterial producer [4]. The culture time was 14 days, and BNC gel-films were further on separated from the culture medium and washed [4].

The greatest concentration of reducing sugars during saccharification was achieved for CM pulp and was 40.5 ± 0.2 g/L; the yield of reducing sugars was $90.9 \pm 0.2\%$ on a substrate weight basis. The concentration reducing sugars during saccharification of NAM pulp was lower by 8.8 ± 0.1 g/L and accounted for 31.7 ± 0.2 g/L; the yield of reducing sugars was $71.2 \pm 0.2\%$ on a substrate weight basis.

To sum up, this study demonstrated that nutrient broths for the biosynthesis of BNC could be prepared by saccharification of Miscanthus pulps. The pulping method was found to have no measurable impact on the BNC yield: the yield varied from 5 to 6%, depending on the chemical modification method. This suggests that BNC can be biosynthesized in nutrient media derived from Miscanthus by using the *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiont.

To sum up, this study demonstrated that nutrient broths for the biosynthesis of BNC could be prepared by saccharification of Miscanthus pulps. The pulping method was found to have no measurable impact on the BNC yield: the yield varied from 5 to 6%, depending on the chemical modification method. This suggests that BNC can be biosynthesized in nutrient media derived from Miscanthus by using the *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiont.

The research was supported by the Russian Science Foundation (project № 17-19-01054).

References:

1. Singh O., Panesar P.S., Chopra H.K. Response surface optimization for cellulose production from agro industrial waste by using new bacterial isolate C18 // *Food Sci. Biotechnol.* 2017. Vol. 26. № 4. P. 1019-1028.
2. Jozala A.F., Pértile R.A.N., Santos C.A., Carvalho Santos-Ebinuma V., Seckler M.M., Gama F.M., Pessoa Jr.A. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99. P. 1181-1190.
3. Budaeva V. V., Makarova E. I., Gismatulina Y. A. Integrated Flowsheet for Conversion of Non-woody Biomass into Polyfunctional Materials // *Key Eng. Mater.* 2016. Vol. 670. P. 202–206.
4. Yurkevich D.I. and Kutysheva V.P. *Medusomyces (Tea Fungus): Research History, Composition, Physiological and Metabolic Peculiarities* // *Biophysics.* 2002. Vol. 47. № 6. P.1116-1129.

УДК: 577.154.2 + 542.952 + 579.22; 577.152.1

ИММОБИЛИЗОВАННАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ЛИПАЗА КАК БИОКАТАЛИЗАТОР НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СИНТЕЗА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ

П.В.Нуруллина

Новосибирский государственный технический университет, Россия, 630073, Новосибирск, пр. К. Маркса, 20
 e-mail: nvpolina1@gmail.com

Приготовлены гетерогенные биокатализаторы на основе липазы, иммобилизованной на наноструктурированных углеродных материалах, таких как многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ) и нановолокна (НВУ). Исследованы свойства данных биокатализаторов: ферментативная активность и операционная стабильность в реакциях низкотемпературного синтеза сложных эфиров.

Ключевые слова: рекомбинантная липаза, углеродные нанотрубки, адсорбция, биокатализаторы, этерификация

В настоящее время гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованной липазы производятся в промышленном масштабе. Востребованность таких биокатализаторов объясняется способностью липазы катализировать процессы не только в водной среде (гидролиз триглицеридов), но и в среде органических растворителей (синтез сложных эфиров, ацидолиз, переэтерификация триглицеридов, алкоголиз, аминотриэтерификация). Такие биокатализаторы используются в пищевой промышленности для получения жиров специального назначения, заменителей дорогостоящих масел какао и молочных жиров; в основном и тонком органическом синтезе для получения сложных эфиров и разделения энантиомеров [1]. Тем не менее, проблема приготовления гетерогенных биокатализаторов остается актуальной и количество публикаций по изучению иммобилизации липазы с использованием различных носителей, в том числе наноуглеродных материалов, продолжает расти [2].

В данной работе исследована адсорбционная иммобилизация рекомбинантной липазы из *Thermomyces lanuginosus*, продуцируемой специально сконструированным штаммом метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* (обознач. rPichia/lip), на многослойных углеродных нанотрубках (МУНТ), в том числе, содержащих атомы азота (N-МУНТ), а также углеродных нановолокнах (НВУ). Приготовленные биокатализаторы изучены в реакции низкотемпературного синтеза сложных эфиров, включая бутиловый эфир энантовой кислоты.

Сравнительное исследование адсорбции липазы rPichia/lip на МУНТ и N-МУНТ показало, что величина адсорбции, равная в среднем 100 мг/г, соответствующая образованию монослоя из адсорбированных белковых молекул, практически не зависит от типа углеродного адсорбента. В то же время, величина адсорбции на НВУ при практически одинаковых параметрах текстуры (удельная поверхность, диаметр и длина волокон) в три раза меньше по сравнению с МУНТ. Было обнаружено, что выраженное влияние на удельную активность адсорбированной липазы оказывают гидрофильно-гидрофобные свойства носителя. Так, гидрофилизация поверхности углеродных нанотрубок путем введения атомов азота в структуру графеновых плоскостей, образующих стенки МУНТ, приводит к увеличению активности гетерогенных биокатализаторов в среднем в 2,5 раза.

Исследование субстратной специфичности иммобилизованной липазы показало, что максимальная скорость этерификации наблюдается для гептановой кислоты и н-бутанола. Определены кинетические параметры для данной реакции, протекающей в безводной среде органических растворителей (смеси гексана и диэтилового эфира) при 25 °С. Константа Михаэлиса для гептановой кислоты и максимальная скорость реакции составляют 0,25 М и $6,4 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$ соответственно. Приготовленные биокатализаторы отличаются высокой операционной стабильностью в периодическом процессе синтеза сложных эфиров; так, после 36 реакционных циклов (720 ч) сохранилось 85 % исходной биокаталитической активности.

Построены изотермы адсорбции липазы на МУНТ. Приготовлены гетерогенные биокатализаторы методом адсорбционной иммобилизации липазы на НВУ и МУНТ. Изучена кинетика синтеза н-бутилгептаната в присутствии полученных гетерогенных биокатализаторов. Определены параметры ферментативной реакции синтеза н-бутилгептаната: $V_{max} = 6,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л $\cdot$ сек, K_m составляет 0,25 М. Исследовано влияние гидрофобно-гидрофильного баланса между носителем и ферментом. Показано, что приготовленные гетерогенные биокатализаторы обладают высокой операционной стабильностью.

Литература:

1. *Handbook of Industrial Biocatalysis* / Ed. By Ching T. Hou. – Taylor & Francis, 2005. – 616 p.
2. Shweta Shah, Kusum Solanki, Munishwar N Gupta. Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes // *Chemistry central journal*. – V.1. – 2007. – P. 11-14.

UDC: 577.154.2 + 542.952+ 579.22; 577.152.1

IMMOBILIZED RECOMBINANT LIPASE AS A BIOCATALYST OF LOW-TEMPERATURE SYNTHESIS OF ETHERS

P.Nurullina

Novosibirsk State Technical University, Russia, 630073, Novosibirsk, K. Marx avenue, 20
e-mail: nvpolina1@gmail.com

Heterogeneous biocatalysts based on lipase immobilized on nanostructured carbon materials, such as multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) and nanofibres (NVU), were prepared. The properties of these biocatalysts: the enzymatic activity and operational stability in the reactions of low-temperature synthesis of esters, were studied.

Key words: recombinant lipase, carbon nanotubes, adsorption, biocatalysts, esterification

Currently, heterogeneous biocatalysts based on immobilized lipase are produced on an industrial scale. The demand for such biocatalysts is explained by the ability of lipase to catalyze processes not only in an aqueous medium (triglyceride hydrolysis), but also in an organic solvent medium (ester synthesis, acidolysis, triglyceride interetherification, alcoholysis, aminolysis). Such biocatalysts are used in the food industry to produce specialty fats, substitutes for expensive cocoa butter and milk fats; in the basic-type and fine organic synthesis for the preparation of esters and the separation of enantiomers [1]. Nevertheless, the problem of preparing heterogeneous biocatalysts remains relevant and the number of publications on the study of the immobilization of lipase using various carriers, including nanocarbon materials, continues to grow [2].

In this paper, the adsorption immobilization of recombinant lipase from *Thermomyces lanuginosus*, produced by a specially designed strain of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* (symbol rPichia/lip), on multiwalled carbon nanotubes (MWCNT), including those containing nitrogen atoms (N-MWCNT), and carbon nanofibers (NVU) was studied. The prepared biocatalysts are studied in the reaction of low-temperature synthesis of esters, including butyl ester of enanthic acid.

A comparative study of the adsorption of rPichia/lip lipase on MWCNTs and N-MWCNTs showed that the amount of adsorption equal to an average of 100 mg / g, appropriate to the formation of a monolayer of adsorbed protein molecules, is almost independent of the type of carbon adsorbent. However, the amount of adsorption on the NVU is three times less compared with multiwalled carbon nanotubes. It was found that a significant effect on the activity of adsorbed lipase has hydrophilic-hydrophobic properties of the carrier. Thus, hydrophilization of the surface of carbon nanotubes by introducing nitrogen atoms into the structure of graphene planes forming the walls of MCNTs leads to an increase in the activity of heterogeneous biocatalysts by an average of 2.5 times.

A study of the substrate specificity of immobilized lipase showed that the maximum esterification rate was observed for heptanoic acid and n-butanol. The kinetic parameters for this reaction occurring in an non-aqueous medium of organic solvents (a mixture of hexane and diethyl ether) at 25 °C have been determined. The Michaelis constant for heptanoic acid and the maximum reaction rate are 0.25 M and $6.4 \cdot 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, respectively.

The prepared biocatalysts are distinguished by high operational stability in the batch process of the synthesis of esters; so, after 36 reaction cycles (720 h), 85% of the initial biocatalytic activity was retained.

Isotherms of lipase adsorption on MWCNTs were constructed. Heterogeneous biocatalysts are prepared by the method of adsorption immobilization of lipase on NVU and MWCNT. The kinetics of the synthesis of n-butylheptanate was studied in the presence of obtained heterogeneous biocatalysts. The parameters of the enzymatic reaction of the synthesis of n-butylheptanate are determined: $V_{\max} = 6.4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}$, K_m is 0.25 M. The effect of hydrophobic-hydrophilic balance between carrier and enzymes was investigated. It is shown that the prepared heterogeneous biocatalysts have high operational stability.

References:

1. *Handbook of Industrial Biocatalysis* / Ed. By Ching T. Hou. – Taylor & Francis, 2005. – 616 p.
2. Shweta Shah, Kusum Solanki, Munishwar N Gupta. Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes // *Chemistry central journal*. – V.1. – 2007. – P. 11-14.

УДК 544.77.022

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ОБОЛОЧЕК НА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

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

Проведено исследование состава конъюгатов золотых наночастиц диаметром от 20 до 50 нм с белками, наиболее часто используемыми в аналитических системах. С использованием метода флуоресцентной спектроскопии сопоставлены зависимости состава полученных конъюгатов от концентрации белка при синтезе и pH среды иммобилизации.

Ключевые слова: коллоидное золото, наночастицы, иммобилизация, иммуноглобулин G, бычий сывороточный альбумин

На сегодняшний день золотые наночастицы (ЗНЧ), модифицированные биомолекулами, являются одними из наиболее часто используемых в биоаналитических системах детектирующих агентов. Хотя изучению реагентов на основе ЗНЧ посвящено большое число работ, ряд важных вопросов остается открытыми, в частности, оценка плотности посадки биомолекул на поверхности золотой частицы. Для выявления общих закономерностей формирования белковой шубы на поверхности ЗНЧ было проведено многофакторное изучение характеристик конъюгатов, отличающихся размером частиц, природой сорбируемого белка и его концентрацией, а также составом реакционной среды.

Суммируя полученные данные, мы можем предложить модель образования конъюгатов ЗНЧ – белок в различных условиях. Данная модель основана на известных представлениях о структуре ЗНЧ в растворе. Поверхность золотой частицы заряжена отрицательно (поверхностный потенциал около -50 мВ). Расположение катионов вокруг анионного слоя приводит к формированию двойной ионной оболочки вокруг наночастиц, которая порождает силы отталкивания между ними. Данная ионная оболочка является причиной стабильности коллоидного раствора.

Согласно предложенной модели, при pH ниже изоэлектрической точки сорбируемого белка, положительно заряженная белковая молекула притягивается к поверхности частицы и легко конъюгируется с ней до образования монослоя. При повышении pH выше изоэлектрической точки, напротив, отрицательно заряженная белковая молекула отталкивается от поверхности. При этом связывание белка с поверхностью возможно за счет донорно-акцепторных, ван-дер-ваальсовых и др. взаимодействий, если кинетической энергии белковой молекулы достаточно для преодоления электростатического барьера. То есть электростатическое отталкивание приводит лишь к кинетической заторможенности сорбции и уменьшению прочности связывания, но не предотвращает его. Согласно экспериментальным данным, этот эффект более выражен для БСА с изоэлектрической точкой в кислой области (pI 4.7-6.0), чем для IgG (pI 6.4-9.0). Данный эффект наблюдается и для Ig G, но влияние щелочной среды ослаблено, так как при подщелачивании Ig G приобретает меньший отрицательный заряд, чем БСА.

С увеличением pH отрицательный заряд на поверхности частиц увеличивается, соответственно, увеличивается слой противоионов вблизи частицы. Кроме того, сорбция первого слоя белка приводит к еще большему увеличению отрицательного заряда вблизи поверхности и дополнительному расширению слоя противоионов. Благодаря этому отрицательно заряженные белковые молекулы могут электростатически связываться с увеличившейся катионной «шубой». Предположительно, именно взаимодействие с катионной «шубой» является причиной появления полислоев сорбированного белка, так как согласно данным фракционирования в поперечном поле повышение pH не способствует усилению белок-белковых взаимодействий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 14.613.21.0080 от 22.11.2017, уникальный идентификатор RFMEFI61317X0080).

UDC 544.77.022

STUDY OF MECHANISMS OF PROTEIN SHELLS FORMATION ON GOLD NANOPARTICLES

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 conjugates of gold nanoparticles with a diameter from 20 to 50 nm and protein most often used in analytical systems were studied. Using the method of fluorescence spectroscopy, the dependences of the composition of the obtained conjugates on the protein concentration during synthesis and the pH of the immobilization medium are compared.

Key words: colloidal gold, nanoparticles, immobilization, immunoglobulin G, bovine serum albumin

Currently, gold nanoparticles (GNPs), modified by biomolecules, are among the most frequently used detection agents in bioanalytical systems. Although a large number of papers are focused on GNP-based reagents, a number of important questions remain open, in particular, the estimation of the density of biomolecules on the GNP surface. To identify the general patterns of formation of a protein coat on the GNP surface, a multifactor study of the conjugates differing in particle size, nature of the sorbed protein and its concentration, as well as the composition of the reaction medium, was carried out.

Summarizing the data obtained, we propose a model of the GNP–protein conjugates formation under various conditions. This model uses some basic statements about the structure of GNP in solution. The GNP surface is negatively charged (surface potential is about -50 mV). The arrangement of cations around the anionic layer leads to the formation of a double ionic shell around the nanoparticles, which generates repulsive forces between them. This ion shell causes stability of the colloidal solution.

According to the proposed model, at a pH below the isoelectric point of the protein to be sorbed, a positively charged protein molecule is attracted to the surface of the particle and is easily conjugated to it until a monolayer is formed. When the pH rises above the isoelectric point, on the contrary, the negatively charged protein molecule repels itself from the surface. In this case, protein binding to the surface is possible due to donor–acceptor, van der Waals, and other interactions, if the kinetic energy of the protein molecule is sufficient to overcome the electrostatic barrier. That is, electrostatic repulsion leads only to kinetic inhibition of sorption and a decrease in the strength of the binding, but does not prevent the conjugation. According to experimental data, this effect is more pronounced for bovine serum albumin (BSA) with an isoelectric point in the acidic region (pI 4.7–6.0) than for IgG (pI 6.4–9.0). This effect is also observed for immunoglobulin G (IgG), but the effect of an alkaline medium is weakened, since when alkalizing, IgG acquires a smaller negative charge than BSA.

With increasing pH, the negative charge on the surface of the particles increases, respectively, the layer of counter-ions near the particle increases. In addition, the sorption of the first protein layer leads to a greater increase in the negative charge near the surface and to the additional expansion of the layer of counter-ions. Due to this, negatively charged protein molecules can electrostatically bind to the increased cationic coat. Presumably, the interaction with the cationic coat causes the appearance of multi-layers of sorbed protein, since according to the data of field-flow fractionation studies, an increase in pH does not enhance protein-protein interactions.

This study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant agreement No 14.613.21.0080 on 22.11.2017, unique identifier RFMEFI61317X0080).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Нечаева Н. Л., Богинская И. А., Курочкин И. Н.

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН
Россия, Москва, ул. Косыгина, 4, 119334
e-mail: Nechaeva.N.L@yandex.ru

Получены ГКР-субстраты, специфичные для определения сахаров и гликированных белков. Субстраты позволяют количественно определять гликированный альбумин в физиологических концентрациях в модельных системах и плазме крови человека.

Ключевые слова: комбинационное рассеяние; гигантское комбинационное рассеяние; ГКР-субстраты; гликированные белки; альбумин

Новые ГКР-субстраты были использованы для селективного определения гликированных белков с применением фенолбороновой кислоты. Шероховатая поверхность ГКР-субстрата обеспечивает усиление сигнала комбинационного рассеяния аналита благодаря локальному усилению электромагнитного поля. Поверхность субстрата была модифицирована раствором 4-меркаптофенолбороновой кислоты.

Модельные сахара были использованы для проверки возможности селективного связывания подложки с диолами. Главные отличия ГКР-спектров подложки, обработанной раствором сахара и необработанной, относятся к колебаниям 4-мФБК (999, 1016, 1072 и 1590 cm^{-1}). Для разделения пула спектров сахаров и контроля использовали анализ главных компонент.

Также ГКР-субстраты были использованы для определения гликированного и негликированного альбумина человека с высокой точностью. Была построена калибровочная зависимость с различными концентрациями гликированного альбумина (ГА). Были измерены образцы плазмы человека от трёх разных доноров и предсказаны значения ГА с помощью калибровки. Полученные значения ГА совпадают со значениями независимой лаборатории в пределах погрешности. Новые ГКР-субстраты, модифицированные 4-мФБК, позволяют количественно определять ГА в плазме человека.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYCATED ALBUMIN BY SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY

Nechaeva N. L., Boginskaya I. A., Kurochkin I. N.

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS
Russia, Moscow, Kosygina str., 4, 119334
e-mail: Nechaeva.N.L@yandex.ru

Specific SERS-substrates for sugar and glycated protein determination were obtained. These substrates allow quantification of glycated albumin in physiological concentrations in model system and in human plasma.

Key words: Raman spectroscopy; surface-enhanced Raman spectroscopy; SERS-substrates; glycated proteins; albumin

New silver SERS-substrates were applied for glycated proteins selective determination using phenylboronic acid. The rough surface of the substrates provides an increase of Raman signal of analyte due to local enhancement of electromagnetic field. The surface was modified with 4-mercaptophenyl boronic acid (4-mPBA).

Model saccharides were taken to test the ability of substrate to bind selectively with diols. The main differences in the SERS-spectra of sugar treated SERS-substrate and non-treated one are manifested in the bands 999, 1016, 1072 and 1590 cm^{-1} , which refer to the vibrations of the 4-mPBA. Principal component analysis was used to distinguish batch of Raman spectra of sugar treated SERS-substrate and the control batch.

Furthermore, SERS-substrates were used to discriminate glycated and non glycated human albumin with high accuracy. Calibration curve with different concentration of glycated albumin (GA) was built. Three real samples of human plasma were tested with calibration curve and values of GA were predicted. The obtained GA values are

equal to the values of the independent laboratory within the error. New silver SERS-substrates modified by 4-mPBA allow quantitative determination of glycosylated albumin in human plasma.

УДК 577.152.31

КОЭКСПРЕССИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ *UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS* С ТРИГГЕРНЫМ ФАКТОРОМ ПСИХРОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *DEVOSIA PSYCHROPHILA* И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЕ СВОЙСТВ

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, Российская федерация, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д.5
e-mail: sorokina@catalysis.ru

В данной работе проведено исследование эффективности экспрессии термостабильной эстеразы estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* в присутствии триггерного фактора бактерии *Devosia psychrophila*. Полученный фермент был протестирован в реакции гидролиза этилового эфира (R,S)-кетопрофена и показал энантиоселективность в отношении (S)-этилкетопрофена.

Ключевые слова: эстераза, коэкспрессия, триггерный фактор, кетопрофен

Термостабильные эстеразы нашли применение в различных областях промышленности, благодаря большому разнообразию свойств, включая широкую субстратную специфичность, регио- и энантиоселективность. Основным недостатком их применения является высокая стоимость получения ферментов, связанные, в том числе, с образованием телец включения при его экспрессии.

В данной работе для повышения продукции термостабильной рекомбинантной эстеразы estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* в клетках *E. coli* BL21(DE3) впервые была проведена ее коэкспрессия с триггерным фактором (TF) психрофильной бактерии *D. psychrophila*. Для определения оптимальных параметров коэкспрессии были исследованы такие факторы, как температура и продолжительность процесса, а также концентрация индуктора IPTG. В результате в оптимальных условиях коэкспрессии эстеразы и TF (16 °C, 20 ч, 0,5 mM IPTG) активность estUT1 в растворимой фракции клеточного лизата увеличилась с 25,4 EA мг⁻¹ до 230,2 EA мг⁻¹.

Исследование свойств эстеразы estUT1 показало, что фермент отличается высокой стабильностью в широком диапазоне pH (5,0-9,0), сохраняя свыше 95% от своей первоначальной активности после 1 ч инкубации в буферах с соответствующим значением pH. Отмечена высокая термостабильность фермента – эстераза сохраняла свыше 69% от первоначальной активности после 6 ч инкубации при 50-70 °C, а время ее полуинактивации при 60 °C составило 15 ч. Эстераза estUT1 была исследована в реакции гидролиза этилового эфира (R,S)-кетопрофена. Наибольшая активность фермента наблюдалась при pH 8,0, температуре 50 °C, а оптимальное время реакции составило 24 ч. Также оценивалось влияние различных добавок (органических растворителей, ПАВ и ионных жидкостей) на активность эстеразы estUT1 в целевой реакции. Было установлено, что максимальный энантиомерный избыток (ee_p) (S)-кетопрофена наблюдался в присутствии 10 об.% [Bmim][HSO₄] и составил 15,5%, а относительная активность эстеразы увеличилась более, чем в два раза.

Таким образом, в работе было показано увеличение продукции эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* коэкспрессией с TF *D. psychrophila*. Высокая активность и стабильность эстеразы позволит эффективно применять ее в качестве биокатализатора в реакциях гидролиза сложноэфирных связей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-38-00386 мол_а.

UDC 577.152.31

CO-EXPRESSION OF THERMOSTABLE ESTERASE FROM *UREIBACILLUS THERMOSPHAERICUS* WITH TRIGGER FACTOR OF *DEVOSIA PSYCHROPHILA* AND STUDY OF ITS PROPERTIES

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

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

In this work, we studied the efficiency of expression of thermostable esterase estUT1 of bacterium *Ureibacillus thermosphaericus* with the trigger factor of bacterium *Devosia psychrophila*. The esterase was tested in the hydrolysis reaction of (R,S)-ketoprofen ethyl ester and showed enantioselectivity towards (S)-ketoprofen ethyl ester.

Key words: esterase, co-expression, trigger factor, ketoprofen

Thermostable esterases are widely used in industry, due to the large variety of properties, including broad substrate specificity, regio- and enantioselectivity. The main disadvantage of their use is a high production costs due to low protein expression as a result of its aggregation and formation of inclusion bodies.

In this study, to increase the protein production of the thermostable recombinant esterase estUT1 from *U. thermosphaericus*, it was co-expressed with the trigger factor (TF) of the psychrophilic bacterium *D. psychrophila* in *E. coli* BL21(DE3) cells. To determine the optimal parameters of co-expression, factors such as temperature and duration of the process, as well as the concentration of the inducer IPTG were studied. As a result, the activity of estUT1 in the soluble fraction of cell lysate increased from 25,4 EA mg⁻¹ to 230,2 EA mg⁻¹ under optimal conditions of esterase and TF co-expression (16 °C, 20 h, 0,5 mM IPTG).

The study of esterase estUT1 properties showed that the enzyme is highly stable over a wide pH range (5,0–9,0), retaining over 95% of its initial activity after 1 h of incubation in buffers with an appropriate pH. This highly thermostable esterase retained over 69% of its initial activity after 6 h of incubation at 50–70 °C, and the time of its half inactivation at 60 °C was 15 h. The esterase estUT1 was examined in reaction of hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester. The highest enzyme activity was at pH 8,0, temperature 50 °C, and the optimal reaction time was 24 h. The effect of various additives (organic solvents, surfactants and ionic liquids) on esterase activity in the hydrolysis reaction was also determined. It was found that the maximum enantiomeric excess (ee_p) 15,5% of the (S)-ketoprofen was achieved in the presence of 10 vol.% [Bmim][HSO₄], and the relative activity of esterase increased more than twice.

Thus, the study showed an increase of the production of thermostable esterase from the bacterium *U. thermosphaericus* by co-expression with TF of *D. psychrophila*. The high activity and stability of the esterase makes it an effective biocatalyst of ester hydrolysis reactions.

The work was carried out with the financial support of the RFBR grant No. 18-38-00386 mol_a.

УДК 577.152.1; 541.64

ЛАККАЗА-КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ СИНТЕЗ ПОЛИ (3,4-ЭТИЛЕНДИОКСИТИОФЕНА) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИСТИРОЛСУЛЬФОНАТА НАТРИЯ И МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

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

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

² МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, 1/3;

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

e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru; ezaitseva2008@gmail.com

Проведен одностадийный безмедиаторный синтез электропроводящего поли(3,4-этилендиокситиофена) (PEDOT) с использованием полистиролсульфоната натрия (PSS) в качестве матрицы и лакказы в качестве катализатора. Предложенный синтез прост и протекает в мягких условиях. Ферментативный подход позволил провести полимеризацию мономера 3,4-этилендиокситиофена (EDOT) в присутствии PSS и многостенных углеродных нанотрубок (MWCNT). Получен композит PEDOT/PSS/MWCNT с высокой удельной емкостью.

Ключевые слова: ферментативный матричный синтез, электропроводящие полимеры, лакказа, поли(3,4-этилендиокситиофен), композит на основе многостенных углеродных нанотрубок

Электропроводящие полимеры являются перспективными материалами для интеграции с живыми системами благодаря их смешанной проводимости как электронного, так и ионного типа. Особое положение среди большого числа проводящих полимеров занимает поли(3,4-этилендиокситиофен) (PEDOT) благодаря высокой стабильности, низкому окислительно-восстановительному потенциалу и высокой прозрачности в р-легированном состоянии. Первоначально считалось, что PEDOT является нерастворимым полимером. Проблема растворимости была решена путем использования водорастворимого полиэлектролита, полистиролсульфоната натрия (PSS), в качестве добавки, уравнивающей заряд, во время полимеризации 3,4-этилендиокситиофена (EDOT) и получения интерполимерного комплекса PEDOT/PSS, который в настоящее время является лидером по использованию в области биоэлектроники. Композиты PEDOT и многостенных углеродных нанотрубок (MWCNT) могут найти широкое применение в солнечных батареях вместо оксида индия-олова (ITO).

Традиционным методом, используемым для полимеризации EDOT в сочетании с PSS, является химическое окисление в жестких условиях с использованием таких окислителей, как FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ и $\text{Fe}(\text{TsO})_3$ [1-3].

В настоящей работе предложен экологически чистый синтез водно-дисперсионного комплекса PEDOT/PSS и композита PEDOT/PSS/MWCNT путем проведения ферментативной окислительной полимеризации EDOT в отсутствие редокс-медиатора. Синтез отличается простой и протекает в мягких условиях. В качестве биокатализатора использовали грибную лакказу *Trametes hirsuta* с высоким окислительно-восстановительным потенциалом. Окислителем в ферментативной реакции является молекулярный кислород, что представляет большое преимущество для реакций окислительного сочетания. Ферментативную окислительную полимеризацию 3,4-этилендиокситиофена (EDOT) проводили в присутствии водорастворимого полистиролсульфоната натрия (PSS), выполняющего функцию матрицы. Показано, что pH реакционной среды и ионы цинка Zn^{2+} влияют на скорость полимеризации EDOT.

Полученный водно-дисперсионный комплекс PEDOT/PSS был охарактеризован методами УФ-видимой спектроскопии, ИК-Фурье спектроскопии, а также просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Спектральные характеристики комплекса PEDOT/PSS, синтезированного с помощью фермента, оказались очень близки к характеристикам PEDOT/PSS, полученного традиционным химическим способом.

Ферментативную полимеризацию мономера EDOT также проводили в присутствии PSS и многостенных углеродных нанотрубок (MWCNT). Полученный композит PEDOT/PSS/MWCNT обладал электропроводностью $\sim 5,7$ См/см и высокой удельной электрохимической емкостью ~ 246 Ф/г, рассчитанной по данным циклических вольтамперограмм при скорости сканирования потенциала 5 мВ/сек.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-00378а.

Литература:

1. Groenendaal L., Jonas F., Freitag D., Pielartzik H., Reynolds J.R. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: past, present, and future// Adv. Mater. 2000. Vol. 12. № 7. P. 481–494.
2. Louwet F., Groenendaal L., Dhaen J., Manca J., Van Luppen J., Verdonck E., Leenders L. PEDOT/PSS: synthesis, characterization, properties and applications// Synth. Met. 2003. Vol. 135–136. № 4. P. 115–117.
3. Wang J., Cai G., Zhu X., Zhou X. Oxidative chemical polymerization of 3, 4-ethylenedioxythiophene and its applications in antistatic coatings// J Appl. Polym. Sci. 2012 Vol. 124. № 1. P. 109–115.

UDC 577.152.1; 541.64

LACCASE-CATALYZED SYNTHESIS OF POLY(3,4-ETHYLENEDIOXYTHIOPHENE) IN COMBINATION WITH SODIUM POLYSTYRENE SULFONATE AND MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES

Vasil'eva I.S.¹, Shumakov G.P.¹, Morozova O.V.¹, Khlupova M.E.¹, Vasil'ev R.B.², Zaitseva E.A.³, Yaropolov A.I.¹

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

² M.V. Lomonosov Moscow State University, of Materials Science, Leninskie Gory 1/3, 119991, Moscow, Russia;

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

e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru; ezaitseva2008@gmail.com

A one-stage redox-mediator-free synthesis of conducting poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) has been performed using sodium polystyrene sulfonate (PSS) as a template and laccase as a catalyst. The proposed synthesis is simple and proceeds under mild conditions. The enzymatic approach enabled to carry out the EDOT polymerization in the presence of PSS and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). A PEDOT/PSS/MWCNT composite with a high specific capacitance was obtained.

Key words: enzymatic template polymerization, conducting polymers, laccase, poly(3,4-ethylenedioxythiophene), composite multi-walled carbon nanotubes

Conducting polymers are promising materials for integration with living systems due to their mixed conduction of both electronic and ionic charge carriers. Among various conducting polymers, poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) is one of the most important, since it displays a high stability, low redox potential and high transparency in the p-doped state. PEDOT was initially found to be an insoluble polymer. The solubility problem was solved using the water-soluble polyelectrolyte, sodium polystyrene sulfonate (PSS), as a charge-balancing dopant during 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT) polymerization to yield PEDOT/PSS interpolymer complex. PEDOT/PSS is a leader material in the field of bioelectronics. PEDOT and multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) composites can find application in solar batteries instead of ITO.

The common method used for EDOT polymerization in combination with PSS is chemical oxidation under harsh conditions using such oxidants as FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ and ferric tosylate [1-3].

In this work the environment-friendly synthesis of water-dispersible PEDOT/PSS complex and PEDOT/PSS/MWCNT composite using enzymatic oxidative EDOT polymerization without any redox mediators is proposed. The synthesis is simple and proceeds under mild conditions.

A high-redox potential laccase from fungus *Trametes hirsuta* was used as a biocatalyst. This enzyme only requires molecular oxygen as an oxidant, which represents a great advantage for oxidative coupling reactions. The enzymatic oxidative polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT) was performed in the presence of water-soluble sodium polystyrene sulfonate (PSS) served as a template. It was shown that the pH of the reaction medium and Zn^{2+} ions influenced the rate of EDOT polymerization. The resulting water-dispersible PEDOT/PSS complex was characterized by UV-Vis and Fourier transformed infrared spectroscopy, as well as by transmission electron microscopy. The enzymatically synthesized complex showed spectral characteristics very close to those of PEDOT/PSS obtained by the conventional chemical method.

Enzymatic EDOT polymerization was also carried out in the presence of PSS and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). The resulting PEDOT/PSS/MWCNT composite had a conductivity of ca. 5.7 S/cm and rather high specific electrochemical capacitance of ca. 246 F g⁻¹, calculated from cyclic voltammograms at a potential scan rate of 5 mV s⁻¹.

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 17-04-00378a.

References:

1. Groenendaal L., Jonas F., Freitag D., Pielartzik H., Reynolds J.R. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: past, present, and future// *Adv. Mater.* 2000. Vol. 12. № 7. P. 481–494.
2. Louwet F., Groenendaal L., Dhaen J., Manca J., Van Luppen J., Verdonck E., Leenders L. PEDOT/PSS: synthesis, characterization, properties and applications// *Synth. Met.* 2003. Vol. 135–136. № 4. P. 115–117.
3. Wang J., Cai G., Zhu X., Zhou X. Oxidative chemical polymerization of 3, 4-ethylenedioxythiophene and its applications in antistatic coatings// *J Appl. Polym. Sci.* 2012 Vol. 124. № 1. P. 109–115.

УДК: 577.114, ББК: 28.072

МАСШТАБИРОВАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Г.Ф.Миронова

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

В данной работе проведено масштабирование циклического биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ) симбиотической культурой *Medusomyces gisevii* Sa-12 в нестерильных условиях в емкостях объемом до 104 л. Выполнено 11 циклов биосинтеза БНЦ, при этом в качестве инокулята для последующего цикла использовалась культуральная среда, полученная в предыдущем цикле биосинтеза. Кроме того, каждый цикл состоял из двух этапов: первичного и вторичного культивирования. Вторичное культивирование осуществлялось на остатках культуральной среды, не использованной в качестве инокулята. Таким образом, реализована концепция безотходного производства, при этом достигнута максимальная утилизация глюкозы из питательной среды; показана стабильность работы симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 в качестве продуцента БНЦ; установлен эффект повышения выхода БНЦ на этапе вторичного культивирования в каждом цикле; получено 18,7 кг гель-пленок БНЦ различной толщины и размеров: толстые (4-10 мм) и тонкие (1 мм) гель-пленки размерами 37×37 см, 49,5×69,5 см и 140×140 см.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, *Medusomyces gisevii*, масштабирование, циклический биосинтез, двухэтапное культивирование

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – уникальный материал, синтезируемый аэробными бактериями, который завоевал мировой интерес благодаря своим физико-механическим и химическим характеристикам (трехмерная структура, высокие показатели чистоты, механической прочности, кристалличности, водопоглощающей способности и степени полимеризации, а также биосовместимости). Как самостоятельный материал, так и в композиции с другими компонентами, БНЦ имеет широкий спектр применения в биотехнологической, пищевой, химической, электронной и других отраслях промышленности, а в особенности – в медицинской [1]. В связи с высокой востребованностью БНЦ, актуальной задачей является масштабирование технологии её биосинтеза, а в связи с высокой себестоимостью БНЦ – создание безотходного производства.

В ИПХЭТ СО РАН разработана методика биосинтеза БНЦ симбиотической культурой *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической питательной среде, при этом максимальный выход БНЦ на 21 сутки культивирования составил 13 % [2]. Целью настоящей работы являлось масштабирование процесса биосинтеза БНЦ. Одновременно с этим решались следующие задачи:

- разработка основ безотходного циклического биосинтеза БНЦ;
- максимальная утилизация глюкозы из питательной среды;
- изучение возможности биосинтеза БНЦ в условиях нестерильного, но чистого помещения.

Первичный биосинтез БНЦ осуществлялся с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической питательной среде, приготовленной по методике [2] в емкости из нержавеющей стали размерами 49,5×69,5×5,0 см; общий объем среды 10 л; доля инокулята 10 %; соотношение объема емкости к объему среды 1,7:1; условия нестерильного, но чистого помещения. В качестве инокулята для первичного культивирования взята семисуточная культура *Medusomyces gisevii* Sa-12, выращенная на синтетической питательной среде в стерильных условиях. Анализы концентрации глюкозы, уровня pH и численности микроорганизмов в процессе культивирования проводились по стандартным методикам. После первичного культивирования в течение 7 суток гель-пленка БНЦ отделялась от культуральной среды и направлялась на взвешивание, промывку и стерилизацию; основная часть культуральной среды использовалась в качестве инокулята для следующего биосинтеза БНЦ; остающаяся часть культуральной среды разливалась по емкостям для вторичного биосинтеза БНЦ.

Всего было выполнено 11 циклов биосинтеза БНЦ. Выход БНЦ, рассчитанный от концентрации глюкозы в среде, варьировал от 2,4 % до 28 %. Низкие значения выхода БНЦ наблюдались при понижении температуры окружающей среды, что естественно. Установлен эффект повышения выхода БНЦ на этапе

вторичного культивирования в каждом цикле, т.е. при биосинтезе БНЦ на обедненной питательной среде. Таким образом, с помощью двухэтапного культивирования достигается максимальная утилизация глюкозы из питательной среды.

Успешно масштабирован биосинтез БНЦ: в результате эксперимента получено 18,7 кг гель-пленок БНЦ различной толщины и размеров: толстые (4-10 мм) и тонкие (1 мм) гель-пленки размерами 37×37 см, 49,5×69,5 см и 140×140 см. Показана возможность проведения как минимум 11 циклов биосинтеза БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 в условиях нестерильного помещения, что свидетельствует о стабильности работы данного продуцента и перспективности его применения в промышленных условиях.

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

Литература:

1. Moniri M, Boroumand Moghaddam A, Azizi S, et al. Production and Status of Bacterial Cellulose in Biomedical Engineering. *Nanomaterials* (Basel). 2017;7(9):257. Published 2017 Sep 4. doi: 10.3390/nano7090257.
2. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. Vol. 54, № 2. P. 179–187.

UDC: 577.114

SCALE-UP OF REPEATED-BATCH BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL NANOCELLULOSE

G.Mironova

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

The repeated-batch biosynthesis of bacterial nanocellulose (BNC) by the *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiotic strain under non-sterile conditions in vessels of up to 104 L in volume was scaled up. Eleven repeating cycles of biosynthesis were run, in which case the culture broth from the preceding cycle was used as inoculum for the next cycle. Besides, each cycle involved two stages: primary and secondary culture. The secondary culture was carried out using the residual growth medium unused as inoculum. The non-waste production concept was thus implemented, whereby the maximum utilization of glucose from the nutrient broth was achieved. The stable performance of the *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiotic strain as a producer of BNC was shown, and the effect of an increase in BNC yield at the stage of secondary culture in each cycle was revealed. A total of 18.7 kg of BNC gel-films with different thickness and size were obtained: thick (4–10 mm) and thin (1 mm) gel films with dimensions of 37×37 cm, 49.5×69.5 cm and 140×140 cm.

Key words: bacterial nanocellulose, *Medusomyces gisevii*, scale-up, repeated-batch biosynthesis, two-stage culture

Bacterial nanocellulose (BNC) is a unique material being produced by aerobic bacteria, which has gained the global interest owing to its physicochemical and chemical characteristics (three-dimensional structure, high purity, mechanical strength, crystallinity, water absorption capacity, degree of polymerization, and biocompatibility). Both as a self-sustained material and as a composite with other components, BNC has a wide range of applications in biotechnological, food, chemical, electronics and other industries, especially in medicine [1]. Because BNC is in high demand, it is a topical challenge to scale up the technology of its biosynthesis, and because the prime cost of BNC is high – to set up the non-waste production.

A biosynthetic procedure for BNC using the *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiotic strain in a synthetic culture broth has been devised at the IPCET SB RAS, by which the maximum yield of BNC on the 21st day of culture is 13 % [2]. The objective of this study was to scale up the BNC biosynthesis process. Simultaneously with that, the following tasks were being handled:

- development of fundamentals of non-waste repeated-batch biosynthesis of BNC;
- maximum utilization of glucose from culture broth;

- study of possible biosynthesis of BNC in a non-sterile but clean room.

The primary biosynthesis of BNC was carried out using symbiotic strain *Medusomyces gisevii* Sa-12 in a synthetic nutrient broth prepared by the reported procedure [2]: in a stainless vessel with dimensions of 49.5×69.5×5.0 cm; 10 L total broth volume; 10 % inoculum proportion; 1.7:1 vessel volume-to-broth volume ratio; in a non-sterile but clean room. As the inoculum for primary culture, *Medusomyces gisevii* Sa-12 grown for 7 days in a synthetic nutrient broth under sterile conditions was used. Glucose concentration, pH level and microbial abundance during the cultivation were analyzed by standard analytical methods. Following primary culture for 7 days, the BNC gel-film was separated from the growth medium, weighed, washed and sterilized. Most of the culture medium was employed as inoculum for the next biosynthesis of BNC, the remainder being poured out into vessels for secondary culture of BNC.

A total of 11 cycles of repeated-batch biosynthesis of BNC were run. The BNC yield calculated as glucose concentration in the medium varied from 2.4 % to 28 %. Low BNC yield values were observed when the ambient temperature was lowered, which is natural. The effect of an increase in BNC yield was revealed at the stage of secondary culture in each cycle, that is, in the biosynthesis of BNC in a depleted culture broth. Thus, the two-stage cultivation provided a maximum utilization of glucose from the culture medium.

The scale-up of BNC biosynthesis was a success: the experiment resulted in 18.7 kg of BNC gel-films with different thickness and size: thick (4–10 mm) and thin (1 mm) gel films with dimensions of 37×37 cm, 49.5×69.5 cm and 140×140 cm. To sum up, this study demonstrated that at least 11 cycles of repeated-batch biosynthesis of BNC by *Medusomyces gisevii* in a non-sterile room could be run, which suggests that this producer exhibits a stable performance and holds promise for use on an industrial scale.

The research was supported by the Russian Science Foundation (project #17-19-01054) using equipment provided by the Biysk Regional Center for Shared Use of Scientific Equipment (IPCET SB RAS, Biysk).

References:

1. Moniri M, Boroumand Moghaddam A, Azizi S, et al. Production and Status of Bacterial Cellulose in Biomedical Engineering. *Nanomaterials* (Basel). 2017;7(9):257. Published 2017 Sep 4. doi: 10.3390/nano7090257.
2. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. Vol. 54, No. 2. pp. 179–187.

УДК 619.15

ОПТИМАЛЬНАЯ СИСТЕМА МНОГОСТУПЕНЧАТОЙ БИОКОНВЕРСИИ ОТХОДОВ И СЫРЬЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Понкратов А.С., Валеева Р.Т., Нуртдинов Р.М., Понкратова С.А., Шулаев М.В.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия
420015, Казань, ул. К. Маркса, 68
e-mail: studchemcyb@gmail.com

Проводится исследования оптимальных способов приготовления питательных сред на основе мягких методов для выращивания биомассы микроорганизмов и получения ценных продуктов способами многоступенчатой биоконверсии.

Ключевые слова: биотехнологическая переработка отходов; биоконверсия; химия растительного сырья, мягкий гидролиз, целлюлозосодержащего сырья, ферментализ, безотходное производство

Эффективное превращение отходов целлюлозосодержащего сырья в биологически усвояемые сахара является сложной задачей. Проблема использования ресурсов целлюлозосодержащего сырья осложняется тем, что существующие традиционные технологии гидролиза растительного сырья с применением сильных кислот и щелочей связаны с образованием значительного количества побочных продуктов, ингибирующих рост микроорганизмов и биосинтез ими ряда целевых веществ. При этом получаемые в гидролизной промышленности среды содержат не более 2-3% сахаров. Перерабатывать такие среды экономически невыгодно вследствие высоких энергетических и приведенных затрат. Поэтому важнейшей задачей является разработка оптимального способа многоступенчатой биоконверсии для приготовления питательных сред и дальнейшего выращивания биомассы микроорганизмов на основе гидролизатов целлюлозосодержащего сырья, с получением высоко ценных продуктов: кормовых и пищевых добавок, аминокислот.

Поэтому в последние годы растет интерес к развитию способов рационального использования ресурсов и переработки отходов. В свою очередь биоконверсия вторичного растительного сырья, может являться основой для построения эффективных биотехнологических производств с получением особо ценных продуктов: белковых кормовых добавок, биоспиртов, аминокислот и других биологически активных веществ. Растительное сырьё и отходы, подвергаясь предварительной обработке и действию ферментных комплексов, является хорошим субстратом для микроорганизмов, которые используются в биотехнологических процессах для микробиологического синтеза. Эффективное превращение отходов растительного целлюлозосодержащего сырья в биологически усвояемые сахара является сложной задачей, так получаемые в гидролизной промышленности среды содержат недостаточное для дальнейшей биоконверсии количество сахаров, что делает их переработку не целесообразным. Поэтому важнейшей задачей является разработка оптимальных способов приготовления питательных сред на основе мягких методов для выращивания биомассы микроорганизмов и получения ценных продуктов способами многоступенчатой биоконверсии.

Основной целью исследования является поиск оптимальных способ биоконверсии отходов растительного, для достижения этой цели необходимо рассмотреть следующие задачи:

1. поиск оптимальных режимов предобработки растительного сырья для его дальнейшей биоконверсии;
2. исследование возможности применения полученных питательных сред для роста и развития штаммов микроорганизмов;
3. структурная и параметрическая оптимизация процессов биоконверсии, по средствам математического моделирования и планирования эксперимента;
4. интенсификация процесса биоконверсии с получением полезных веществ, как кормовых дрожжей, биоспиртов и др.

Литература:

1. Федорова О.В., Понкратова С.А., Валеева Р.Т., Исламгулов И.Р. Питательные среды в производстве медицинских и ветеринарных препаратов // Вестник технологического университета. — 2017. — Т. 20, №. 4. — С. 130-133;
2. Гордеева Ю.Л., Емельянов В.М., Гордеева Е.Л., Понкратова С.А. Оптимальные условия биотехнологического получения молочной кислоты по величине протока // Вестник технологического университета. — 2015. — Т. 18, №. 12. — С. 197-200.

UDC 619.15

OPTIMAL SYSTEM OF MULTI-STEPS BIOCONVERSION OF WASTE AND RAW MATERIALS

Ponkratova A.S., Valeeva R.T., Nurtudinov R.M., Ponkratova S.A., Shulaev M.V.

Kazan National Research Technological University, Department of Chemical Cybernetics
Karl-Marx-Str. 68, 420015 Kazan
e-mail: studchemcyb@gmail.com

Research is being conducted on the optimal methods for preparing nutrient media based on soft methods for growing biomass of microorganisms and obtaining valuable products by means of multi-step bioconversion.

Key words: biotechnological waste processing; bioconversion; chemistry of vegetable raw materials, soft hydrolysis, cellulose-containing raw materials, fermentolysis, non-waste production

Efficient conversion of waste cellulosic raw materials into bioavailable sugars is a difficult task. The problem of using the resources of cellulose-containing raw materials is complicated by the fact that the existing traditional technologies for the hydrolysis of plant raw materials using strong acids and alkalis are associated with the formation of significant amounts of by-products that inhibit the growth of microorganisms and their biosynthesis of a number of target substances. At the same time, the media obtained in the hydrolysis industry contain no more than 2-3% of sugars. It is economically unprofitable to process such media due to high energy and reduced costs. Therefore, the most important task is to develop an optimal method of multi-stage bioconversion for preparing nutrient media and further growing the biomass of microorganisms based on cellulose-containing hydrolysates of raw materials, with obtaining highly valuable products: feed and food additives, amino acids.

Therefore, in recent years, there has been a growing interest in the development of ways of rational use of resources and waste treatment. In turn, the bioconversion of secondary plant materials may be the basis for building effective biotechnological production with the production of especially valuable products: protein feed additives, bio alcohol, amino acids and other biologically active substances. Plant materials and waste products, being subjected to pretreatment and the action of enzyme complexes, are a good substrate for microorganisms that are used in biotechnological processes for microbiological synthesis. Efficient conversion of waste of plant cellulose-containing raw materials into bioavailable sugars is a difficult task, as the environments obtained in the hydrolysis industry contain an amount of sugars insufficient for further bioconversion, which makes their processing not expedient. Therefore, the most important task is the development of optimal methods for preparing nutrient media based on soft methods for growing biomass of microorganisms and obtaining valuable products by means of multi-step bioconversion.

The main objective of the study is to find the optimal way of bioconversion of plant waste, to achieve this goal it is necessary to consider the following tasks:

1. search for optimal modes of preprocessing plant materials for its further bioconversion;
2. study of the possibility of using the obtained nutrient media for the growth and development of microbial strains;
3. structural and parametric optimization of bioconversion processes, by means of mathematical modeling and experiment planning;
4. Intensification of the process of bioconversion with the production of useful substances, such as fodder yeast, bio-alcohols, etc.

УДК: 577.151

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ, НАГРУЖЕННЫХ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗОЙ

Ходак Е.М., Щербакова В.К., Красноштанова А.А.

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20.
e-mail: aak28@yandex.ru

Подобраны условия получения микрочастиц карбоната кальция, нагруженных панкреатической липазой. Изучено два способа включения панкреатической липазы в микрочастицы карбоната кальция: сорбции и соосаждения. Показано преимущество метода соосаждения.

Ключевые слова: панкреатическая липаза, карбонат кальция, иммобилизация, высвобождение фермента из микрокапсул

Одной из задач инженерной энзимологии является разработка технологии получения и использования иммобилизованных ферментов. К преимуществам иммобилизованных ферментов в сравнении с нативными следует отнести: простота отделения биокатализатора от реакционной среды, возможность повторного использования фермента, более высокая устойчивость и стабильность фермента.

В качестве неорганических носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также силихромы, оксиды металлов. Основное преимущество неорганических носителей – легкость регенерации.

В последнее десятилетие возрос интерес к использованию в качестве носителей пористых микро- субмикрочастиц карбоната кальция, что обусловлено их высокой сорбционной способностью, простотой приготовления и низкой себестоимостью. В отличие от других неорганических пористых частиц, используемых для иммобилизации биоактивных веществ (чаще всего это частицы диоксида кремния [1], диоксида титана [2], производных фосфата кальция [3]), карбонат кальция легко растворим в кислой среде, что может стать эффективным способом его удаления из реакционной среды.

В настоящее время большое количество исследований посвящено разработке эффективных форм липазы. Поэтому целью данной работы является подбор условий получения микрочастиц карбоната кальция, содержащих панкреатическую липазу.

Было изучено два способа включения панкреатической липазы в микрочастицы карбоната кальция: метод сорбции и метод соосаждения. В первом случае смешивали равные объемы эквимоларных (0,33 М)

водных растворов карбоната натрия и хлорида кальция. После перемешивания осадок карбоната кальция отделяли фильтрованием, промывали ацетоном и сушили. Далее полученные микрочастицы суспендировали в растворе фермента, после чего отделяли центрифугированием.

Во втором случае смешивали одновременно смешивали эквимольные растворы хлорида кальция и карбоната натрия с раствором фермента. После перемешивания осадок микрочастиц отделяли от супернатанта центрифугированием [4].

Было установлено, что при использовании метода соосаждения удается сократить время взаимодействия носителя и фермента. Изучение динамики высвобождения фермента из микрокапсул в нейтральной среде показало, что 75-80% фермента высвобождается в течение первых 2 часов, а за 5 часов наблюдается практически полное высвобождение липазы из микрочастиц, что обеспечивает пролонгированное действие фермента. Установлено, что включение панкреатической липазы в микрочастицы не приводит к снижению ее активности.

Таким образом, полученные микрочастицы карбоната кальция, нагруженные панкреатической липазой, в дальнейшем могут быть использованы для гидролиза жировых субстратов, например, при получении биотоплива.

Литература:

1. Ohulchanskyy T.Y., Roy I., Goswami L.N. et al. Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 9. P. 2835.
2. Тихонов Б. Б. и др. Физико-химические исследования биокатализатора на основе иммобилизованной на модифицированном диоксиде титана пероксидазы хрена // *Бюллетень науки и практики.* – 2017. – №. 12. – С. 98-104.
3. Schwiertz J., Wiehe A., Gräfe S. et al. Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. // *Biomater.* 2009. V. 30. № 19. P. 3324-3331.
4. Т.Н. Бородина, Л.Д. Румш, С.М. Кунижев, Г.Б. Сухоруков, Г.Н. Ворожцов, Б.М. Фельдман, Е.А. Марквичева. Полиэлектrolитные микрокапсулы как системы доставки биологически активных веществ // *Биомедицинская химия.* – 2007. – Т. 53 – № 5. – С. 557-565.

UDC: 577.151

OBTAINING CALCIUM CARBONATE MICROPARTICLES LOADED BY PANCREATIC LIPASE

Khodak E.M., Shcherbakova V.K., Krasnoshtanova A.A.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia
125480, Moscow, st. Geroev Panfilovtsev, 20.
e-mail: aak28@yandex.ru

The conditions for obtaining calcium carbonate microparticles loaded with pancreatic lipase were selected. Two ways to incorporate pancreatic lipase into calcium carbonate microparticles have been studied: sorption and coprecipitation. The advantage of the coprecipitation method is shown.

Key words: pancreatic lipase, calcium carbonate, immobilization, enzyme release from microcapsules

One of the tasks of engineering enzymology is the development of technology for the production and use of immobilized enzymes. The advantages of immobilized enzymes in comparison with the native should include: ease of separation of the biocatalyst from the reaction medium, the ability to reuse the enzyme, higher stability and stability of the enzyme.

The materials from glass, clay, ceramics, graphite carbon black, silica gel, as well as silochromes and metal oxides are most often used as inorganic carriers. The main advantage of inorganic carriers is the ease of regeneration.

In the last decade, interest in using porous micro- and submicroparticles of calcium carbonate as carriers has increased, due to their high sorption capacity, ease of preparation and low cost. Unlike other inorganic porous particles used to immobilize bioactive substances (most often these are particles of silicon dioxide [1], titanium dioxide [2], calcium phosphate derivatives [3]), calcium carbonate is easily soluble in an acidic environment, which can become effective by way of its removal from the reaction medium.

Currently, a large number of studies devoted to the development of effective forms of lipase. Therefore, the purpose of this work is to select the conditions for obtaining calcium carbonate microparticles containing

pancreatic lipase.

Two ways to incorporate pancreatic lipase into calcium carbonate microparticles were studied: the sorption method and the coprecipitation method. In the first case, equal volumes of equimolar (0.33 M) aqueous solutions of sodium carbonate and calcium chloride were mixed. After stirring, the precipitate of calcium carbonate was separated by filtration, washed with acetone and dried. Next, the obtained microparticles suspended in the enzyme solution, and then separated by centrifugation.

It was found that when using the coprecipitation method it is possible to reduce the time of interaction between the carrier and the enzyme. Studying the dynamics of the release of the enzyme from microcapsules in a neutral medium showed that 75-80% of the enzyme is released within the first 2 hours, and in 5 hours there is an almost complete release of lipase from the microparticles, which ensures a prolonged action of the enzyme. It has been established that the inclusion of pancreatic lipase in microparticles does not reduce its activity.

Thus, the obtained calcium carbonate microparticles loaded with pancreatic lipase can be further used for the hydrolysis of fatty substrates, for example, in the preparation of biofuels.

References:

1. Ohulchanskyy T.Y., Roy I., Goswami L.N. et al. Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy. // Nano Lett. 2007. V. 7. No. 9. P. 2835.
2. Tikhonov B. B., et al. Physical and chemical studies of the biocatalyst based on horseradish peroxidase immobilized on modified titanium dioxide // Science and Practice Bulletin. - 2017. - no. 12. - p. 98-104.
3. Schwiertz J., Wiehe A., Gräfe S. et al. Calcium phosphate nanoparticles as carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. // Biomater. 2009. V. 30. No. 19. P. 3324-3331.
4. T.N. Borodin, LD Rumsh, S.M. Kunizhev, G.B. Sukhorukov, G.N. Vorozhtsov, B.M. Feldman, E.A. Markvicheva. Polyelectrolyte microcapsules as systems delivery of biologically active substances // Biomedical chemistry. - 2007. - V. 53 - № 5. - p. 557-565.

УДК 577.151.6

РАЗЛИЧНЫЕ ТОКСИНЫ КАК ФЕРМЕНТНЫЕ СУБСТРАТЫ

Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Ахундов Р.Ф., Асланлы А.Г., Степанов Н.А., Сенько О.В., Маслова О.В., Махлис Т.А.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, РФ
Москва 119991, Ленинские горы 1, строение 3
e-mail: elena_efremenko@list.ru

Представлен анализ современного уровня развития исследований по ферментативной деструкции различных (природных и синтетических) токсинов, в том числе с привлечением к обсуждению литературных данных и собственных результатов.

Ключевые слова: токсины, субстраты, ферменты, детоксикация, биокатализ

Сегодня известно, что причиной интоксикации человека могут быть различные вещества синтетического и природного происхождения. При этом в качестве источников природных токсинов могут выступать различные биологические объекты (растения, животные, бактерии, грибы). Общие механизмы их токсичного воздействия сопряжены с функционированием систем синтеза вторичных мессенджеров, с ионными каналами и системами, контролирующими транскрипцию и трансляцию генетической информации.

Применение современных методов компьютерного моделирования и возможность использования электронных библиотек, содержащих информацию о структуре и свойствах разных ферментов, обеспечивает возможность скрининга биокатализаторов, способных к эффективной детоксификации высокотоксичных соединений. Подбор таких ферментов может обеспечить: - разложение токсинов в ходе биотехнологических процессов, направленных на решение различных экологических проблем; - снижение уровня бактериальной резистентности к антибиотикам; - повышение безопасности продуктов питания; - решение медицинских проблем, в том числе связанных с возможностью применения биологических антидотов, характеризующихся высокоспецифичным каталитическим действием в отношении разных токсинов, в том числе имеющих природное происхождение (микотоксины, фитотоксины, бактериотоксины и др).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Проект №18-29-17069).

UDC 577.151.6

DIFFERENT TOXINS AS ENZYMATIC SUBSTRATES

Efremenko E.N., Lyagin I.V., Ahundov R.F., Aslanli A.G., Stepanov N.A., Senko O.V., Maslova O.V., Makhlis T.A.

*M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Lenin's Hills, 1/3, Moscow, 119991, Russia
e-mail: elena_efremenko@list.ru*

The analysis of modern level of scientific investigations developing in the area of enzymatic destruction of various (natural and synthetic) toxins is performed by using known literature data and own results.

Key words: toxins, substrates, enzymes, detoxification, biocatalysis

Today it is known that various substances of synthetic and natural origin can be the cause of human intoxication. At the same time, various biological objects (plants, animals, bacteria, fungi) can act as sources of natural toxins. The general mechanisms of their toxic effects are associated with the functioning of secondary messenger synthesis systems, with ion channels and systems that control the transcription and translation of genetic information.

The use of modern computer simulation methods and the possibility of using electronic libraries containing information on the structures and properties of various enzymes, allows screening biocatalysts capable of efficient detoxification of different highly toxic compounds. The selection of such enzymes can provide: - decomposition of toxins in the course of biotechnological processes aimed at solving various environmental problems; - reducing the level of bacterial resistance to antibiotics; - increase in food safety; - solution of medical problems, including those associated with the possibility of using biological antidotes, characterized by highly specific catalytic activity against various toxins, including those of natural origin (mycotoxins, phytotoxins, bacteriotoxins, etc.).

The work was financially supported by RFBR (Project No. 18-29-17069).

УДК 621.039.75

РАЦИОНАЛЬНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ (НАНОКОМПЗИТНЫХ) ПОЛИМЕРНЫХ ПОКРЫТИЙ ДЛЯ БИОСЕНСОРНЫХ ПРИМЕНЕНИЙ

Сиголаева Л.В., Шумянцева В.В., Курочкин И.Н., Ян Дж., Пергушов Д.В., Шахер Ф.Х.

*Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы 1/3
e-mail: lsigolaeva@belozersky.msu.ru*

Работа описывает модификацию поверхности электрохимических сенсоров полимерными пленками и полимерсодержащими нанокompозитными покрытиями на основе углеродных наноматериалов, а также рассматривает применение модифицированных электродов для прямого электрохимического анализа (био)молекул.

Ключевые слова: электроанализ, нанокompозит, углеродные наноматериалы, полимеры, ферменты, ДНК, гемопротеины, тонкие пленки

Чувствительность электрохимического анализа часто определяется эффективностью сопряжения анализируемого объекта с нанокompозитным материалом, используемым для модификации сенсорного элемента. От эффективности сопряжения зависит качество анализа, его чувствительность и, в конечном итоге, рыночная конкурентоспособность сенсора в целом. Углеродные наноматериалы, часто включаемые в состав нанокompозитов (многостенные углеродные нанотрубки, оксид графена и др.), служат для улучшения проводимости композита и эффективности переноса электронов. Высокая гидрофобность и трудности диспергирования углеродных наноматериалов в подходящем растворителе сильно осложняют процесс модификации поверхности электродов. Данная проблема может быть решена путем применения амфифильных полимеров, таких как поли(ионные жидкости) или диблоксополимеры. Полимеры в составе подобных нанокompозитов, в частности, амфифильные ионогенные диблоксополимеры, выполняют много-функциональную роль. Гидрофобный блок диблоксополимера используется для сольубилизации

углеродного материала, в то время как ионогенный (заряженный) блок обеспечивает специфическое взаимодействие с анализируемыми (био)молекулами. Способы модификации поверхности электрода могут включать послойное нанесение наноразмерных полимерных пленок методом адсорбции непосредственно на поверхности электрода, причем процесс их формирования зависит от структуры и свойств исходной поверхности/предыдущих слоев, а также от условий, при которых происходит адсорбция (pH, солевой состав и проч.). В работе описаны различные режимы сборки наноразмерных полимерных пленок, нанесенных на проводящие поверхности. В работе также описаны способы получения устойчивых на коллоидном уровне гомогенных водных дисперсий углеродных наноматериалов, солюбилизованных поли(ионными жидкостями) или амфифильными diblock-сополимерами. Последующая модификация электродов данными дисперсиями обеспечивает значительное улучшение характеристик электроанализа целевых (био)молекул. Универсальность и многопрофильность применения подобных покрытий/композитов рассмотрена на примере практически значимого количественного электрохимического анализа гемопротеинов и (поли)нуклеотидов на основе прямой (безреагентной) электрохимической регистрации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Проект РНФ 18-44-04011) и фонда немецкого научного общества (Проект DFG SCHA1640/18-1) в рамках совместного проекта РНФ-DFG.

UDK 621.039.75

RATIONAL DESIGN OF (NANOCOMPOSITE) POLYMERIC COATINGS FOR BIOSENSING APPLICATIONS

Sigolaeva L.V., Shumyantseva V.V., Kurochkin I.N., Yuan J., Pergushov D.V., Schacher F.H.

*Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Leninskie Gory 1/3, Moscow 119991, Russia
e-mail: lsigolaeva@belozersky.msu.ru*

This work reports the modification of electrochemical sensors by polymer films or polymer-based nanocomposites containing carbon nanomaterials together with the application of modified electrodes for direct electrochemical analysis of (bio)molecules.

Key words: electroanalysis, nanocomposite, carbon nanomaterials, polymers, enzymes, DNA, hemoproteins, thin films

The efficient integration of target bioanalyte with a nanostructured electrode surface within man-made electrochemical devices is a crucial aspect when engineering (bio)analytical devices. Generally, integration efficiency determines the quality of an analytical electrochemical device, its sensitivity, and eventually its market competitiveness. Carbon nanomaterials have been widely incorporated to improve layer conductivity and increase the efficiency of electron exchange on the surface of carbon-based electrodes. Both electrodes and carbon nanomaterials are highly hydrophobic, rendering an easy and reproducible modification of electrode surfaces rather challenging. This challenge can be solved using amphiphilic polymers like poly(ionic liquid)s or diblock copolymers, the latter featuring one hydrophobic and one hydrophilic (often ionic) block. The hydrophobic segment(s) of such polymers can adhere to the surface of the electrode or carbon nanomaterials, while the hydrophilic moieties ensure dispersability of carbon nanomaterials in aqueous media and/or can serve as a non-destructive matrix for the subsequent embedment of (bio)molecules.

Nanosized thin polymer films can be constructed directly on the electrode surfaces via adsorption, which is to a great extent determined by the state and structure of the initial surface and/or the pre-adsorbed layers and ruled by different conditions (pH, salt composition, etc.). To demonstrate this, different fabrication regimes and properties of thin polymer/enzyme films deposited onto conductive substrates were examined.

This work also reports successful solubilization of carbon nanomaterials in aqueous media, using poly(ionic liquid)s or ionic amphiphilic diblock copolymers. Beneficial surface modification of electrodes by fine aqueous dispersions of carbon nanomaterials provides a considerable improvement of (bio)sensor performance. Examples of quantitative reagent-less direct electrochemical analysis of nucleic acids and hemoproteins are considered which confirms the versatility and diversity of nanocomposite coatings for electrode modification.

This work was supported by the Russian Science Foundation (RSF, project 18-44-04011) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, project SCHA1640/18-1) within the joint RSF-DFG grant.

УДК 577.154.2 + 542.952+ 579.22; 577.152.1

СОВРЕМЕННЫЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОМПЗИТНЫХ ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Коваленко Г.А.^{1,3}, Перминова Л.В.¹, Кузнецов В.Л.^{1,3}, Беклемишев А.Б.^{1,2}

¹Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

630090, Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 5

²Научно-исследовательский институт биохимии СО РАН, Новосибирск, Россия

630117 Новосибирск, ул. Тимакова, 2

³Новосибирский государственный Университет, Новосибирск, Россия

630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

e-mail: galina@catalysis.ru

Современные наноструктурированные углеродные материалы в виде углеродных нанотрубок, нановолокон и наносфер исследованы как функциональные компоненты, вводимые в состав гетерогенных биокатализаторов, приготовленных путем «замуровывания» лизатов клеток-продуцентов в SiO₂-ксерогель. Проведены сравнительные исследования ферментативной активности и операционной стабильности приготовленных биокатализаторов в зависимости от физико-химических свойств, текстуры и дисперсности вводимых наноуглеродных компонентов.

Ключевые слова: наноструктурированный углерод, ксерогель диоксида кремния, композитные гетерогенные биокатализаторы, иммобилизация, инвертаза, липаза

Сравнительные исследования свойств композитных наноуглерод-силикатных биокатализаторов, приготовленных путем «замуровывания» полностью разрушенных клеток микроорганизмов (лизатов) в SiO₂-ксерогель, показали, что положительный эффект от введения в их состав наноструктурированного углерода в виде нанотрубок/нановолокон/наносфер, определяется следующими факторами: (1) таксономией лизированных микроорганизмов, (2) физико-химическими свойствами углеродного компонента (наноструктурой, гидрофобностью), (3) типом катализируемой ферментами реакции [1]. Например, при изучении композитных биокатализаторов с активностью инвертазы, приготовленных путем иммобилизации автолизатов пекарских дрожжей, было показано, что при введении в их состав многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ) стационарная каталитическая активность увеличилась в 5–6 раз за счет эффективной адгезии автолизатов на МУНТ. Для композитных биокатализаторов с активностью термостабильной липазы, приготовленных путем иммобилизации лизатов рекомбинантного штамма-продуцента *rE.coli/lip*, эффект от введения в их состав наноуглеродного компонента зависел, прежде всего, от типа катализируемой липазой реакции. Так, в реакциях с участием триглицеридов, например, в переэтерификации масло-жировых смесей (при 70–75°C) максимальной ферментативной активностью обладали биокатализаторы без введенного наноуглеродного компонента.

Наноуглеродные компоненты, вводимые в состав композитных биокатализаторов, были расположены в следующий ряд по возрастанию положительного эффекта на увеличение скорости реакций конверсии триглицеридов (гидролиз, переэтерификация): агрегированные в пучки МУНТ ($S_{уд} = 140 \text{ м}^2/\text{г}$) > наносферы (250–480 $\text{м}^2/\text{г}$) > диспергированные до отдельных нанотрубок МУНТ (140–320 $\text{м}^2/\text{г}$). В другой реакции (этерификация жирных кислот алифатическими спиртами в органических растворителях) после введения в состав композитных биокатализаторов агрегированных углеродных нанотрубок диаметром 20–22 нм (140 $\text{м}^2/\text{г}$) их активность увеличилась в 1.5–2 раза [2].

При переходе из водной среды (гидролиз) в неводную (этерификация) активность одного и того же биокатализатора уменьшалась в $>10^4$ раз, в то же время его стабильность в реакции этерификации была на порядки выше, чем в реакции гидролиза, так как в процессе этерификации вода (как продукт) образовывалась в непосредственной близости к иммобилизованной липазе. Благодаря этому, наноуглерод-силикатные биокатализаторы осуществляли низкотемпературный синтез сложных душистых эфиров в периодическом режиме в течение сотен часов.

Таким образом, введение наноструктурированного углеродного компонента в состав композитных биокатализаторов, приготовленных путем «замуровывания» лизатов клеток-продуцентов в SiO₂-ксерогель, является целесообразным и перспективным подходом, если наноуглеродный компонент эффективно адсорбирует лизаты и/или создает благоприятное гидрофильно-гидрофобное окружение иммобилизованному ферменту, в частности, липазе.

Литература:

1. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B., Parmon V.N. Heterogeneous biocatalysts prepared by immuring enzymatic active components inside silica xerogel and nanocarbons-in-silica composites // *Catalysts*. 2018. Vol. 8. № 5. P. 177–198.
2. Перминова Л.В., Коваленко Г.А., Беклемишев А.Б., Мамаев А.Л., Пыхтина М.Б., Рудина Н.А. Каталитические свойства липазы, включенной в наноуглерод-силкатные матрицы в виде лизатов штамма-производителя *rEscherichia coli/lip*, в реакциях биоконверсии триглицеридов и жирных кислот // *Прикл. биохим. микробиол.* – 2018. – Т. 54. – № 1. – С. 46–54.

UDC 577.154.2 + 542.952+ 579.22; 577.152.1

NANOSTRUCTURED CARBON MATERIALS FOR PREPARING COMPOSITE HETEROGENEOUS BIOCATALYSTS

Kovalenko G.A.^{1,3}, Perminova L.V.¹, Beklemishev A.B.², Kuznetsov V.L.^{1,3}

¹Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Av. Akad. Lavrentyeva, 5

²Institute of Biochemistry, Novosibirsk, Russia
630117, Novosibirsk, Timakova str., 2

³Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,
630090, Novosibirsk, Pirogova str., 2
e-mail: galina@catalysis.ru

Modern nanostructured carbon materials in the form of carbon nanotubes, nanofibers, and nanospheres were investigated as functional components included into heterogeneous biocatalysts prepared by “immuring” the lysates of strain-producer cells inside SiO₂-xerogel. Comparative studies of the enzymatic activity and operational stability of the prepared composite biocatalysts were carried out depending on the physicochemical properties, texture and dispersion of nanocarbon components.

Key words: nanostructured carbon, silica xerogel, composite heterogeneous biocatalysts, immobilization, lysates, invertase, lipase

Comparative investigations of the properties of composite nanocarbon-in-silica biocatalysts prepared by immuring completely destroyed microorganisms (lysates) inside SiO₂-xerogel showed that the positive effect of including nanostructured carbons in the form of nanotubes / nanofibres / nanospheres, depended on the origin of the lysed microorganisms, and on the physicochemical properties of the carbon component, and on the type of reaction catalyzed by enzymes [1]. Thus, in the case of composite invertase-active biocatalysts prepared by immuring baker's yeast autolysates into SiO₂-xerogel, it was shown that inclusion of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) inside silica matrix provided increase of the stationary enzymatic activity in 5–6 times due to effective adhesion of autolysates on MWCNT. In the case of composite lipase-active biocatalysts prepared by immuring lysates of the recombinant strain-producer *rE.coli/lip*, the effect of inclusion of the nanocarbons inside SiO₂-xerogel depended primarily on the type of lipase-catalyzed reaction. For example, in the reaction of interesterification of oil-fat blends (at 70–75°C), the prepared biocatalysts without any included nanocarbons demonstrated the maximum enzymatic activity.

The included nanocarbons were arranged in the following sequence by increasing the positive effect on the enhancement of the rates of triglyceride conversion reactions (hydrolysis, interesterification) catalyzing by immobilized lipase: MWCNTs aggregated into bundles (Ssp = 140 m²/g) > nanosphere (250–480 m²/g) > MWCNTs dispersed to single nanotube (140–320 m²/g). In another reaction, the esterification of fatty acids with aliphatic alcohols, the activity of the prepared biocatalysts increased in 1.5–2 times after inclusion of the aggregated carbon nanotubes with a diameter of 20–22 nm (140 m²/g) inside SiO₂ xerogel [2].

It was found that the after changing an aqueous medium (for hydrolysis reaction) to a non-aqueous organic solvents (for esterification reaction) the activity of the same biocatalysts decreased in >10⁴ times, while the operational stability enhanced in orders of magnitude in comparison with an aqueous medium. This phenomenon was explained by the fact that water as a product of the esterification reaction was formed and accumulated in the close proximity to the immobilized lipase. Composite biocatalysts carried out low-temperature synthesis of various esters (fragrant compounds) in a batch mode for several hundreds of hours.

As a conclusion, the experimental data confirmed that the inclusion of nanostructured carbons inside the

heterogeneous biocatalysts prepared by immuring lysates of strain-producers into SiO₂-xerogel was appropriate and perspective approach in the case that the nanocarbons themselves effectively adsorbed lysates and/or created a favorable hydrophilic-hydrophobic environment for immobilized enzyme, in particular for lipase.

References:

1. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B., Parmon V.N. Heterogeneous biocatalysts prepared by immuring enzymatic active components inside silica xerogel and nanocarbons-in-silica composites // *Catalysts*. 2018. Vol. 8. № 5. P. 177–198.
2. Perminova L.V., Kovalenko G.A., Beklemishev A.B., Mamaev A.L., Pyktina M.B., Rudina N.A. Catalytic properties of the lipase in the form of strain-producer *rEscherichia coli*/lip lysates entrapped in nanocarbon-in-silica matrix in the reactions of bioconversion of triglycerides and fatty acids // *Appl. Biochim. Microbiol.* 2018. Vol. 54. № 1. С. 38–44.

УДК: 577.15; 602.3:579.8

СОЗДАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ

Шашков И.А., Синицын А.П., Сатрутдинов А.Д.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия, 119071, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2.
e-mail: igorshashkov@bk.ru

Получены высокопродуктивные штаммы-продуценты высокоактивных эндо-деполимераз, способных эффективно расщеплять некрахмальные полисахариды злаков, оптимизированы состав питательной среды и условия культивирования полученных штаммов, наработаны промышленные партии ферментных препаратов, которые были успешно испытаны при кормлении поросят и цыплят-бройлеров.

Ключевые слова: *P. verruculosum*, кормовые ферментные препараты, некрахмальные полисахариды, эндо-деполимеразы, ксиланаза Е, эндоглюканаза 2, кормопроизводство

Получение новых, высокоактивных ферментных препаратов, содержащих высокоактивные эндо-деполимеразы, которые способны эффективно расщеплять некрахмальные полисахариды (НПС) злаков, является одной из наиболее приоритетных задач в современном кормопроизводстве. Добавление таких ферментных препаратов (ФП) в корма с преобладанием овса, пшеницы и ржи, используемые при кормлении сельскохозяйственных животных, позволяет значительно снизить расход корма, увеличить суточный прирост животных, а также улучшить их физиологическое состояние.

Методами генетической инженерии на основе реципиентного гриба *Penicillium verruculosum* 537 был получен набор рекомбинантных штаммов – продуцентов высокоактивных эндо-деполимераз. В результате последующей селекции были окончательно отобраны 2 новых штамма – штамм *P. verruculosum* EX13 – продуцент эндоглюканазы 2 (ЭГ2) и ксиланазы Е (КсилЕ) и штамм *P. verruculosum* EX35 – продуцент ксиланазы Е.

Следующим этапом работы была оптимизация питательной среды и процесса культивирования полученных рекомбинантных штаммов. По результатам многочисленных экспериментов нами были получены две новых питательных среды, используемых для культивирования штаммов EX13 и EX35 на лабораторной ферментационной установке и в промышленных условиях – модифицированная ферментационная среда (МФС), применяемая исключительно в лабораторных условиях и промышленная ферментационная среда (ПФС), которая была использована для проведения процессов культивирования в условиях завод «Агрофермент». Использование новых питательных сред и условий культивирования привело к значительному увеличению биосинтеза целевых ферментов, а также к значительному удешевлению конечной стоимости ферментного препарата.

В результате, нам успешно удалось провести масштабирование лабораторного процесса в 40 м³ промышленных ферментёрах в условиях завода «Агрофермент» и получить опытные партии ферментных препаратов «Агроксил Премиум» на основе штамма EX13 и «Агроксил Плюс» на основе штамма EX35. Вес обеих партий составил около 8 тонн. Полученные ФП были испытаны в качестве кормовой добавки при кормлении поросят и цыплят-бройлеров.

В случае кормления поросят ФП применяли на стадии их дорастивания от возраста 45-47 суток (с начальной живой массой 15-16 кг) до достижения живой массы 47-50 кг каждого. ФП вводили в корма в составе премиксов. Наилучший результат был получен при использовании ФП «Агроксил Плюс» в дозировке 100 г/т. – это способствовало повышению среднесуточного прироста поросят на 10%, при этом расход корма на единицу прироста снижался на 6,8%. Экономический расчёт показал, что при добавлении «Агроксил Плюс» в указанной концентрации условная дополнительная прибыль на одну голову составила порядка 270 р.

При включении в комбикорма ФП при кормлении цыплят-бройлеров наилучший результат был получен при использовании ФП «Агроксил Премиум» в дозировке 75 г/т, что привело к увеличению живой массы цыплят-бройлеров на 6,2% на момент окончания кормления (36 суток). Кроме того, наблюдалось увеличение конверсии корма на 6,4% за счёт лучшей переваримости основных питательных веществ корма и разрушения НПС. Наилучшая конверсия корма 1,660 кг корма/кг живого веса так же была отмечена у бройлеров, получавших комбикорм с добавкой 75 г/т ФП Агроксил Премиум.

Таким образом, на основе штамма – реципиента *P. verruculosum* 537 нами были созданы 2 штамма-продуцента кормовых ФП нового поколения – *P. verruculosum* EX13 продуцент ЭГ2 и КсилЕ и *P. verruculosum* EX35 продуцент КсилЕ, которые характеризовались высоким содержанием целевых ферментов, разрушающих НПС. Успешно проведены испытания полученных штаммов в производственных условиях, наработаны промышленные партии ФП и успешно испытаны в качестве кормовой добавки при кормлении поросят и цыплят – бройлеров.

Госзадание: «Разработка новых ферментных комплексов для промышленной биотехнологии и сельского хозяйства на основе грибных систем экспрессии с применением методов генетической инженерии и рационального белкового дизайна ферментативных систем».

UDC: 577.15; 602.3:579.8

CREATION OF ENZYME PREPARATIONS OF THE NEW GENERATION ON THE BASIS OF THE MICELIAL MUSHROOM *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* FOR APPLICATION IN FOOD PRODUCTION

Shashkov I.A., Sinitsyn A.P., Satrutdinov A.D.

The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 119071, Leninsky prospect, 33, str. 2.

e-mail: igorshashkov@bk.ru

High-yielding producer strains of highly active endo-depolymerase, which are able to effectively break down non-starch polysaccharides (NSP) of cereals, were obtained. The composition of the nutrient medium and the culture conditions of the strains obtained were optimized. Industrial batches of enzyme preparations (EP) that have been successfully tested when feeding piglets and broiler chickens have been developed.

Key words: *P. verruculosum*, feed enzyme preparations, non-starch polysaccharides, endo-depolymerase, xylanase E, endoglucanase 2, fodder production

Obtaining new, highly active enzyme preparations that contain highly active endo-depolymerase, which are able to effectively break down non-starch polysaccharides of cereals, is one of the top priorities in modern feed production. Adding such enzyme preparations to food with a predominance of oats, wheat and rye, which are used in feeding farm animals, can significantly reduce feed consumption, increase the daily gain of animals, and improve their physiological state.

A set of recombinant strains producing high activity endo-depolymerases was obtained using genetic engineering methods based on the recipient fungus *Penicillium verruculosum* 537. As a result of the subsequent selection, 2 new strains were finally selected - the strain *P. verruculosum* EX13 - producing endoglucanase 2 (EG2) and xylanase E (XylE) and the strain *P. verruculosum* EX35 - producing XylE.

The next stage of work was the optimization of the nutrient medium and the process of cultivation of the obtained recombinant strains. According to the results of numerous experiments we have obtained two new nutrient media used for the cultivation of strains EX13 and EX35 in a laboratory fermentation plant and in industrial conditions - modified fermentation medium (MFS) used exclusively in laboratory conditions and industrial fermentation medium (IFM) which was used for carrying out cultivation processes in the conditions of the plant "Agroferment". The use

of new nutrient media and cultivation conditions led to a significant increase in the biosynthesis of target enzymes, as well as to a significant reduction in the cost of the final cost of the enzyme preparation.

In the case of feeding piglets, EP was used at the stage of their rearing from the age of 45-47 days (with an initial live weight of 15-16 kg) until reaching a live weight of 47-50 kg each. EP was introduced into the feed in the composition of the premix. The best result was obtained when using the EP «Agroxil Plus» at the dosage of 100 g / t. - this contributed to an increase in the average daily growth of pigs by 10%, while the feed consumption per unit of growth decreased by 6.8%. The economic calculation showed that when «Agroxil Plus» was added at the indicated concentration, the conditional additional profit per head amounted to about 270 rubles.

With the inclusion of EP in the feed when feeding broiler chickens, the best result was obtained when using «Agroxil Premium» at a dosage of 75 g / t, which led to an increase in live weight of broiler chickens by 6.2% at the time of termination of feeding (36 days). In addition, an increase in feed conversion by 6.4% was observed due to better digestibility of the main nutrients of the feed and destruction of NSP. The best feed conversion of 1,660 kg of feed / kg of live weight was also noted in broilers fed feed with the addition of 75 g / t EP Agroxil Premium.

Thus on the basis of the *P. verpusulosum* 537 recipient strain, we created 2 producer strains of feed FPs of the new generation - *P. verrusulosum* EX13 producing EG2 and XylE and *P. verrusolulosum* EX35 producing XilE, which were characterized by a high content of target enzymes destroying OPS. Tests of the obtained strains were successfully carried out under production conditions industrial batches of FP were accumulated and successfully tested as a feed additive when feeding piglets and broiler chickens.

Federal program: "Development of new enzyme complexes for industrial biotechnology and agriculture based on mushroom expression systems using genetic engineering methods and rational protein design of enzyme systems."

УДК 577.15.08

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ФОРМЫ ГЕКСАГИСТИДИНСОДЕРЖАЩЕЙ ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗЫ (His₆-OPH) СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Асланлы А.Г., Маслова О.В., Лягин И.В., Сенько О.В., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: elena_efremenko@list.ru

Получены комбинированные ферментные биопрепараты на основе гексагистидинсодержащей орнанофосфатгидролазы (His₆-OPH) и различных антимикробных агентов. Показана стабилизация ферментативной активности His₆-OPH и значительное увеличение эффективности действия антимикробных агентов в составе комбинированных препаратов.

Ключевые слова: комбинированные ферментные биопрепараты, гексагистидинсодержащая орнанофосфатгидролаза, антимикробные агенты

Неконтролируемое потребление антибиотиков привело к стремительному росту и широкому распространению антибиотикорезистентных патогенных микроорганизмов. В связи с этим, сформировалась высокая потребность в поиске эффективной альтернативы известным на сегодняшний день антибиотикам. Так как одним из основных механизмов развития устойчивости патогенных бактерий является развитие так называемого «кворумного ответа» (Quorum Sensing, QS), в качестве одного из путей преодоления антибиотикорезистентности рассматривается подавление эффекта кворума (Quorum Quenching, QQ). Эффект QS проявляется в способности бактериальных клеток в пределах одной популяции взаимодействовать друг с другом, развивая высокорезистентные бактериальные ассоциации. Известно, что основными индукторами развития QS у патогенных грамотрицательных бактерий являются сигнальные молекулы - N-ацилгомосеринлактоны (АГЛ). Для разных бактерий характерен синтез различных молекул АГЛ, при этом длина углеродной цепи молекул АГЛ обычно варьируется от C4 до C18.

Одним из эффективных QQ методов является гидролитическое разрушение АГЛ. Среди известных на сегодняшний день ферментов, способных катализировать гидролиз молекул АГЛ, наибольший интерес представляют лактоназы, так как действуют непосредственно на лактонное кольцо в структуре АГЛ. Одним из таких ферментов является гексагистидинсодержащая орнанофосфатгидролаза (His₆-OPH). Известно, что фермент His₆-OPH помимо своей высокой каталитической активности в процессах гидролиза

ряда фосфорорганических соединений, обладает также лактоназной активностью в отношении ряда молекул АГЛ.

В данной работе получены новые комбинированные биопрепараты на основе фермента His₆-OPH и его полиэлектролитных комплексов и разных β-лактамов антибиотиков (ампициллин, меропенем, имипенем, цефтриаксон) или антимикробными пептидами (АМП), исследованы каталитические характеристики и изменения в эффективности действия антимикробных агентов в отношении различных патогенных грамотрицательных бактерий. Показано, что в составе комбинированных препаратов происходит многократное уменьшение минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков. Установлено, что в присутствии как антибиотиков, так и АМП происходит существенная стабилизация ферментативной активности His₆-OPH, сохраняющего свою лактоназную активность и гидролитическую активность в отношении разных фосфорорганических соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФИ [18-29-17069].

UDC 577.15.08

STABILIZED FORMS OF HEXAHISTIDINE CONTAINING ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE (HIS₆-OPH) WITH SPECIFIC PROPERTIES

Aslanli A.G., Maslova O.V., Lyagin I.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Efremenko E.N.

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
e-mail: elena_efremenko@mail.ru*

Combined enzyme biopreparations based on hexahistidine containing organophosphorus hydrolase (His₆-OPH) and various antimicrobial agents were obtained. The stabilization of enzymatic activity of His₆-OPH and a significant increase in the effectiveness of action of antimicrobial agents in the composition of the combined preparations have been shown.

Key words: combined enzyme biopreparations, hexahistidine containing organophosphorus hydrolase, antimicrobial agents

Uncontrolled consumption of antibiotics has led to the rapid growth and widespread use of antibiotic-resistant pathogens. Thereby, a high need has emerged in the search for an effective alternative to the currently known antibiotics. Since one of the main mechanisms for the development of pathogenic bacteria resistance is the development of the so-called "Quorum Sensing" (QS), one of the ways to overcome antibiotic resistance is Quorum Quenching (QQ). QS is the ability of bacterial cells to interact with each other within one population, developing highly resistant bacterial associations. It is known that the main inducers of the QS development in pathogenic gram-negative bacteria are signaling molecules - N-acyl homoserine lactones (AHLs). Different bacteria are characterized by the synthesis of various AHL molecules, wherein the carbon chain length of AHL molecules usually varies from C₄ to C₁₈.

One of the effective QQ methods is the hydrolytic destruction of AHL molecules. Among the currently known enzymes capable of catalyzing the hydrolysis of AHLs, lactonases are the most interesting, since they act directly on the lactone ring in the structure of AHLs. One of such enzymes is hexahistidine containing organophosphorus hydrolase (His₆-OPH). It is known that the His₆-OPH enzyme, in addition to its high catalytic activity in the processes of hydrolysis of a number of organophosphorus compounds, also exhibits lactonase activity against a number of AHL molecules.

In this work, new combined biopreparations based on the His₆-OPH enzyme and its polyelectrolyte complexes and various β-lactam antibiotics (ampicillin, meropenem, imipenem, ceftioxaone) or antimicrobial peptides (AMPs) were obtained, the catalytic characteristics and changes in the action effectiveness of the antimicrobial agents against various pathogenic gram-negative bacteria were studied. A multiple decrease in the minimum inhibitory concentrations of antibiotics in the composition of the combined preparations has been shown. It has been established that in the presence of both antibiotics and AMPs there is a significant stabilization of the enzymatic activity of His₆-OPH, which retains its lactonase activity and its hydrolytic activity against various organophosphorus compounds.

This work was supported by the Russian Foundation of Basic Research [18-29-17069].

УДК 577.15

СУПЕРКОМПЬЮТЕРНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛОЖНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ КАТАЛИЗА И ФАРМОКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Лущечкина С.В., Массон П., Махаева Г.Ф., Петров К.А., Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Варфоломеев С.Д.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук. 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
e-mail: sofya.lushchekina@gmail.com

В докладе представляются работы по суперкомпьютерному молекулярному моделированию различных механизмов взаимодействий холинэстераз с субстратами и ингибиторами, имеющих биомедицинское значение.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, болезнь Альцгеймера

Работы по компьютерному моделированию в области биохимии, биофизики и фармакологии холинэстераз непосредственно связаны с разработкой лекарственных препаратов для терапии болезни Альцгеймера, миастенических синдромов и отравлений нервными ядами и проводятся с использованием основных современных методов молекулярного моделирования: молекулярный докинг, молекулярная динамика, квантовая механика и комбинированный метод квантовой и молекулярной механики КМ/ММ. В докладе рассматривается весь диапазон механизмов взаимодействий холинэстераз с субстратами и ингибиторами на примере существующих и потенциальных лекарственных препаратов, природными субстратами и токсикантами: (1) исследования механизмов нековалентного ингибирования холинэстераз для разработки препаратов для паллиативной терапии болезни Альцгеймера, улучшающей когнитивные способности пациентов; (2) исследования роли ацетилхолинэстеразы в агрегации амилоидного пептида и развитии болезни Альцгеймера для разработки лекарственной терапии, замедляющей развитие нейродегенеративных процессов; (3) исследование механизмов сложной кинетики ингибирования медленного связыванию для разработки высокоэффективных препаратов для терапии миастенических синдромов со сниженными побочными эффектами; (4) исследования генетического полиморфизма холинэстераз — влияния единичных замен в гене ферментов бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы на их каталитическую активность, в первую очередь, в отношении лекарственных препаратов для разработки подходов и методов персонализированной медицины; (5) исследования механизмов реакций, протекающих в активных центрах холинэстераз: ферментативный гидролиз субстратов, ингибирование фосфорорганическими соединениями и последующие реакции старения фосфорилированного фермента и его возможной реактивации показывают возможные направления разработки т.н. «каталитических биологических» на основе бутирилхолинэстеразы — модификаций фермента, способных к спонтанной реактивации с достаточно высокой скоростью для защиты организма от воздействия фосфорорганических отравляющих веществ.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-03-00043

UDC 577.15

SUPERCOMPUTER MOLECULAR MODELING FOR RESEARCH ON COMPLEX CATALYTIC REACTIONS AND PHARMACOLOGICAL PROBLEMS OF CHOLINESTERASES

Lushchekina S.V., Masson P., Makhaeva G.F., Petrov K.A., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Varfolomeev S.D.

Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences 119334, Russia, Moscow, Kosygina st., 4,
e-mail: sofya.lushchekina@gmail.com

In the present talk, works on supercomputer molecular modeling of interaction mechanisms of cholinesterases with substrates and inhibitors, related to biomedical problems are described.

Ключевые слова: molecular modeling, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease.

Works on computer modeling in the field of biochemistry, biophysics, and pharmacology of cholinesterase are directly related to the development of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease, myasthenic syndromes, and poisoning by nerve agents. The whole set of main modern molecular modeling methods is used: molecular docking, molecular dynamics, quantum mechanics, and combined quantum mechanics and molecular mechanics (QM/MM) methods. In the present talk, all aspects of cholinesterase interaction mechanisms with substrates and inhibitors, including current and potential drugs, natural substrates and toxicants are discussed: (1) study of reversible inhibition mechanisms of cholinesterase for development of drugs against Alzheimer's disease, improving the cognitive abilities of patients; (2) studies of the role of acetylcholinesterase in aggregation of amyloid peptide, progression of Alzheimer's disease, and for the development of new disease modifying drugs; (3) study of the complex kinetic mechanisms of slow-binding inhibition for making highly effective drugs for the treatment of myasthenic syndromes with reduced side effects; (4) studies of enzyme genetic polymorphism — effects of point mutations in the genes of butyrylcholinesterase and carboxylesterase on the catalytic activity of these enzymes against drugs to develop new approaches and methods of personalized medicine; (5) studies of the mechanisms of reactions occurring in the active sites of cholinesterases: enzymatic hydrolysis of substrates, inhibition by organophosphate compounds and subsequent "aging" reactions of phosphorylated enzyme, and its possible reactivation to show new directions for the development of butyrylcholinesterase-based catalytic bioscavengers — enzyme modifications capable of spontaneous reactivation at a rate sufficient to protect the body against the effects of organophosphorus toxicants.

The work is partly supported by RFBR grant #19-03-00043

УДК 577.15

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФОРМИРОВАНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ ДИМЕРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Новичкова Д.А., Луцкеина С.В., Немухин А.В.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия
119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
e-mail: dana.novichkova@gmail.com

Методами молекулярного моделирования показано, что на стабильность димеров холинэстераз влияют как межмолекулярные взаимодействия, так и подвижность элементов белковой структуры.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза; бутирилхолинэстераза; олигомеризация белков; четвертичная структура; молекулярная динамика; модель Маркова

Ацетилхолинэстераза и бутирилхолинэстераза относятся к группе холинэстераз. Ацетилхолинэстераза играет ключевую роль в передаче нервного сигнала в холинэргических синапсах, а бутирилхолинэстераза выполняет функцию биологической ловушки для ядов ацетилхолинэстеразы. Для обеих подгрупп холинэстераз известны различные олигомерные формы, большая часть из которых содержит димеры и тетрамеры (димеры димеров) [1].

Во всех (более 200) кристаллических структурах ацетилхолинэстеразы независимо от каких-либо факторов один из кристаллических контактов представляет собой узел из четырёх альфа спиралей. Полагают, что димер с этим контактом соответствует биологической единице [2]. Среди пятидесяти кристаллографических структур бутирилхолинэстеразы человека только одиннадцать, экспрессированных в клетках *Drosophila melanogaster*, имеют кристаллический контакт с узлом из четырёх альфа спиралей. Структурно от остальных 39 структур их отличает полное гликозилирование.

Анализ физико-химических факторов, определяющих формирование и стабильность димеров холинэстераз человека, позволит объяснить, почему образование узла из четырёх альфа спиралей в случае бутирилхолинэстеразы более чувствительно к условиям и гликозилированию.

Узел из четырёх альфа спиралей образован спиралью $\alpha 13$ и $\alpha 18$ от обоих мономеров, также в контакт вовлечены петли, связанные с этими спиральями.

По результатам анализа изменения поверхности, доступной для растворителя, и электростатических взаимодействий, поверхность контакта димеров ацетилхолинэстеразы более гидрофобна, чем димера

бутирилхолинэстеразы человека; вклад электростатических взаимодействий между петлями в случае ацетилхолинэстеразы более стабилен, чем в случае бутирилхолинэстеразы.

Для уточнения данных был проведён *in silico* аланиновый скрининг [3]. Показано, что у ацетилхолинэстеразы больше стабилизирующих контакт аминокислот на петлях, вовлечённых в контакт, чем у бутирилхолинэстеразы.

Петли, вовлечённые в контакт между мономерами бутирилхолинэстеразы, оказываются менее стабильными на протяжении молекулярнодинамической траектории (анализ траектории произведён при помощи статистической модели цепей Маркова [4]), также они хуже разрешены в кристаллографических структурах, чем остальные аминокислотные остатки бутирилхолинэстеразы. Таким образом, из-за повышенной подвижности, петли оказывают меньшее стабилизирующее влияние.

Электростатическая энергия связывания димера бутирилхолинэстеразы, рассчитанная по методу зонтичной выборки с обменом гамильтонианами [5], оказывается меньше на 15 ккал, чем у ацетилхолинэстеразы.

Таким образом, контакты с геометрически схожими поверхностями могут стабилизироваться различными типами взаимодействий.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Исследование выполнено за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00043)

Литература:

1. Massoulié, J., et al. *Molecular and cellular biology of cholinesterases*//Prog. Neurobiol. 1993. № 41. P. 31.
2. Giles, K. *Interactions underlying subunit association in cholinesterases*//Protein Engineering. 1997. Vol.10. № 6. P.677–685
3. Ramadoss, V., F. Dehez, and C. Chipot. *AlaScan: A Graphical User Interface for Alanine Scanning Free-Energy Calculations*//J Chem Inf Model. 2016. Vol. 56. № 6. P. 1122–1126.
4. Scherer, M.K., et al. *PyEMMA 2: A Software Package for Estimation, Validation, and Analysis of Markov Models*//J Chem. Theory Comput. 2015. Vol. 11. № 11. P. 5525–42.
5. Sugita Y, Kitao A, Okamoto Y. *Multidimensional replica-exchange method for free-energy calculations*//J. Chem. Phys. 2000. № 113. P. 6042–6051

UDC 577.15

PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS DETERMINING THE FORMATION AND STABILITY OF CHOLINESTERASE DIMERS

Novichkova D.A., Lushchekina S.V., Nemukhin A.V.

*The Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119334, Russian Federation, Moscow, Kosygina st., 4
e-mail: dana.novichkova@gmail.com*

Using molecular modeling, it has been shown that the stability of cholinesterase dimers is influenced by both intermolecular interactions and the mobility of the elements of the protein structure.

Key words: acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; protein oligomerization; quaternary structure; molecular dynamics; Markov's model

Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase belong to the cholinesterase family. Acetylcholinesterase plays a key role in the transmission of the nerve signal in cholinergic synapses, and butyrylcholinesterase acts as a bioscavenger for acetylcholinesterase poisons. For both cholinesterases, various oligomeric forms are known, most of which contain dimers and tetramers (dimers of dimers) [1].

In all (more than 200) crystal structures of acetylcholinesterase, regardless of any factors, one of the crystal contacts is a four alpha helix bundle. A dimer with this contact is believed to correspond to a biological unit [2]. Among the fifty crystallographic structures of human butyrylcholinesterase, only eleven, expressed in *Drosophila melanogaster* cells, have the crystal contact with a four alpha helix bundle. Structurally, they are distinguished from the other 39 structures by complete glycosylation.

An analysis of the physicochemical factors determining the formation and stability of human cholinesterase

dimers will explain why the formation of a four alpha helix bundle in the case of butyrylcholinesterase is more sensitive to conditions and glycosylation.

A four alpha helix bundle is formed by $\alpha 13$ and $\alpha 18$ helices from both monomers, and loops bound with the helices involved in contact.

According to the results of the analysis of changes in the surface available for the solvent and electrostatic interactions, the contact surface of acetylcholinesterase dimers is more hydrophobic than the human butyrylcholinesterase dimer; the contribution of electrostatic interactions between loops in the case of acetylcholinesterase is more stable than in the case of butyrylcholinesterase.

To clarify the data, the *in silico* alanine screening was carried out [3]. It was shown that acetylcholinesterase has more stabilizing amino acids on the loops than butyrylcholinesterase.

The loops involved in the contact between the butyrylcholinesterase monomers are less stable throughout the molecular dynamic trajectory (the trajectory analysis was performed using a statistical model of Markov chains [4]), and they are also worse resolved in crystallographic structures than the other butyrylcholinesterase amino acid residues. Thus, due to increased mobility, the loops have a less stabilizing effect.

The binding energy of the butyrylcholinesterase dimer, calculated using the umbrella sampling method with the exchange of Hamiltonians [5], is 15 kcal less than that of acetylcholinesterase.

Thus, contacts with geometrically similar surfaces can be stabilized by various types of interactions.

The research is carried out using the equipment of the shared research facilities of HPC computing resources at Lomonosov Moscow State University

The research was supported by RFBR (project No. 19-03-00043)

References:

1. Massoulie, J., et al. *Molecular and cellular biology of cholinesterases*//*Prog. Neurobiol.* 1993. № 41. P. 31.
2. Giles, K. *Interactions underlying subunit association in cholinesterases*//*Protein Engineering.* 1997. Vol.10. № 6. P.677–685
3. Ramadoss, V., F. Dehez, and C. Chipot. *AlaScan: A Graphical User Interface for Alanine Scanning Free-Energy Calculations*//*J Chem Inf Model.* 2016. Vol. 56. № 6. P. 1122-1126.
4. Scherer, M.K., et al. *PyEMMA 2: A Software Package for Estimation, Validation, and Analysis of Markov Models*//*J Chem. Theory Comput.* 2015. Vol. 11. № 11. P. 5525-42.
5. Sugita Y, Kitao A, Okamoto Y. *Multidimensional replica-exchange method for free-energy calculations*//*J. Chem. Phys.* 2000. № 113. P. 6042–6051

ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

SITOLOGY

1. АКТИВАЦИЯ ГИДРОЛАЗ ВОЛНОВЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ, Карпенко Д. В.	498
HYDROLASES ACTIVATION BY WAVE INFLUENCE, Karpenko D.	499
2. БИОДОБАВКА ИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В ПРОДУКТАХ ГЕРОДИЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ, Красуля О.Н., Юшина Е.А., Богущ В.И., Батурин С. И.	500
BIOSUPPLEMENT FROM MICROSCOPIC FUNGUS IN ELDERLY NUTRITION PRODUCTS, Krasulya O. N., Yushina E. A., Bogush V. I., Baturin S. I.	501
3. БИОКАТАЛИЗ КАК ИНСТРУМЕНТАРИЙ В ТЕХНОЛОГИЯХ ЯГОДНЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ, Алексеенко Е.В.	502
BIOCATALYSIS AS A TOOL IN TECHNOLOGY OF BERRY SEMI-FINISHED PRODUCTS, Alekseenko E. V.	503
4. БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИДЕНТИФИКАЦИИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ, Серба Е.М., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Таджибова П.Ю., Кузнецова Н.А., Римарева Л.В.	504
BIOCATALYTIC PROCESSES IN THE FOOD INDUSTRY AND MODERN APPROACHES OF THE IDENTIFICATION OF ENZYME PREPARATIONS, Serba E.M., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Tadzhibova P.Y., Kuznecova N.A., Rimareva L.V. ...	505
5. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА К ПИЩЕ – БИОПЕКТИН, Бутова С.Н., Музыка М.Ю., Николаева Ю.В.	506
BIOLOGICAL ACTIVE SUPPLEMENT TO FOOD – BIOPECTIN, Butova S. N., Muzyka M.YU., Nikolaeva J.V.	507
6. БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ АНГИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ, Павловская Н.Е., Горькова И.В., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Гуляева К.Н., Костромичева Е.В.	508
BIOTECHNOLOGY PRODUCTS ANGIOPROTECTIVE ACTION, Pavlovskaya N. E. Gorkova I. V., Gagarina I. N., Gavrilova A.Y., Gulyaeva K.N., Kostromicheva E. V.	509
7. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ УМЕРЕННЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ КАК ПРОДУЦЕНТОВ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И ФЕРМЕНТОВ, Романова М. В., Галеева Ю. С., Шустов М. Д., Белодед А. В.	510
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MODERATELY THERMOPHILIC BACTERIA AS PRODUCERS OF PRIMARY METABOLITES AND ENZYMES, Romanova M. V., Galeeva J. S., Shustov M. D., Beloded A. V.	511
8. ВЛИЯНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НА ВЫХОД СОКА ИЗ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ, Степакова Н.Н., Помозова В.А., Киселёва Т.Ф., Фролова Н.А., Шкрабтак Н.В.	512
THE PROSPECTS OF BIOCATALYTIC PROCESSING OF BERRY RAW MATERIALS WITH FOR INCREASE IN AN EXIT OF JUICE, Stepakova N.N., Pomozova V.A., Kiseleva T.F., Frolova N.A., Shkrabtak N.V.	513
9. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ БИОМАССЫ НИЗШИХ ГРИБОВ НА ВИТАМИННУЮ АКТИВНОСТЬ ЖЕЛЕЙНЫХ МАРМЕЛАДОВ, Юшина Е.А., Чечелева О.В., Богущ В.И., Чувашова Ж. А.	514
INFLUENCE OF YEAST'S BIOMASS PREPARATIONS ON ACTIVITY OF JUICE JELLY VITAMINS, Yushina E. A., Chechelova O. V., Bogush V. I., Chuvashova Z. A.	515
10. ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ НА СТАБИЛЬНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ В УЛЬТРАФИТРАЦИОННЫХ КОНЦЕНТРАТАХ, Мельникова Е.И., Богданова Е.В.	516
INFLUENCE OF HEAT TREATMENT ON STABILITY OF WHEY PROTEINS IN ULTRAFILTRATION CONCENTRATES, Melnikova E.I., Bogdanova E.V.	517
11. ВЛИЯНИЕ ФИТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОКОНВЕРСИИ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ, Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Антонова А.А., Ожмегова Е.Н., Серба Е.М.	518
EFFECT OF PHYTOLYTIC ENZYMES ON THE EFFICIENCY OF BIOCONVERSION OF GRAIN RAW MATERIALS, Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Antonova A.A., Ozhmegova E.N., Serba E.M.	519
12. ВЛИЯНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА ГВОЗДИКИ НА ПЕНООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ЛИПИДАМИ, Гуреева М.Д., Чеботарёв С.А., Самусева Ю.В., Зеликина Д.В., Makasa Akwebiwa J., Антипова А.С., Мартиросова Е.И., Мишарина Т.А., Семёнова М.Г.	520
EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL OF CLOVE BUD ON THE FOAMING ABILITIES OF THE COMPLEXES OF THE WHEY PROTEINS ISOLATE WITH BIOLOGICALLY ACTIVE LIPIDS, Gureeva M.D., Chebotarev S.A., Samuseva Y.V., Zelikina D.V., Makasa Akwebiwa J., Antipova A.S., Martirosova E.I., Misharina T.A., Semenova M.G.	521

13. ВЫБОР ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНОГО НАПИТКА С МИКРОПАРТИКУЛЯТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ, Мельникова Е.И., Станиславская Е.Б.	522
SELECTION OF FERROUS CULTURES FOR THE PRODUCTION OF ACID-FOLK DRINK WITH MICROPARTICULATOR OF SERUM PROTEINS, Melnikova E.I., Stanislavskaya E.B.	523
14. ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПОЗИТЫ ИЗ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЗЕРНА ТРИТИКАЛЕ И ГОРОХОВОЙ МУКИ, Куликов Д.С., Гулакова В.А., Колпакова В.В.	525
TWO-COMPONENT PROTEIN COMPOSITES FROM SECONDARY PRODUCTS OF TRITICALE GRAIN AND PEA FLOUR, Kulikov D.S., Gulakova V.A., Kolpakova V.V.	526
15. ЗЕРНОДРОЖЖЕВОЙ - ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СУБСТРАТ, КОРМОВАЯ И ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА ИЗ БАРДЫ, Кудряшов В.Л., Алексеев В.В., Маликова Н.В., Погорельская Н.С.	527
ULTRACONCENTRATE GRAIN AND YEAST - PROMISING SUBSTRATE, FEED AND FOOD ADDITIVE OF BARDS, Kudryashov V.L., Alekseev V.V., Malikova N.V., Pogorzelskaya N.S.	528
16. ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ИЗ БИОМАССЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПИВОВАРЕНИЯ, Юшина Е.А., Богуш В.И., Вакар А.А., Кротов Ю. И.	529
IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY OF YIELD'S BIOMASS PREPARATIONS IN BREWERY TECHNOLOGY, Yushina E. A., Bogush V. I., Vakar A. A., Krotov Y. I.	531
17. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВИДА И КАЧЕСТВА ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ БАРДЫ, ОБРАЗУЮЩЕЙСЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА, Туршатов М.В., Соловьев А.О., Кононенко В.В., Кривченко В.А.	532
STUDY OF THE EFFECT THE TYPE AND QUALITY OF GRAIN RAW MATERIALS ON THE INDICATORS OF THE BARD, FORMED IN THE MANUFACTURE OF ETHYL ALCOHOL, Turshatov M.V., Solovyov A.O., Kononenko V.V. , Krivchenko V.A.	533
18. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ, Ашихмина М.С., Забодалова Л.А.	534
THE STUDY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM PLANT COMPONENTS, Ashikhmina M.S., Zabodalova L.A.	535
19. К ВОПРОСУ О ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РОССИЙСКОГО ВИСКИ, Абрамова И.М., Головачева Н.Е., Морозова С.С., Шубина Н.А., Галлямова Л.П.	536
TO THE QUESTION OF TECHNOLOGY FOR THE RUSSIAN WHISKEY, Abramova I.M., Golovacheva N.E., Morozova S.S., Shubina N.A., Galliamova L.P.	538
20. КОМПЛЕКСЫ ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА С ЛИПОСОМАМИ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА, НАПОЛНЕННЫМИ ТРИГЛИЦЕРИДАМИ РЫБЬЕГО ЖИРА: СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА, Чеботарёв С. А., Гуреева М. Д., Самусева Ю. В., Зеликина Д. В., Makasa Akwebiwa J., Антипова А.С., Мартиросова Е. И., Семёнова М. Г.	539
COMPLEXES OF WHEY PROTEIN ISOLATE WITH LIPOSOMES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LOADED WITH TRIACYLGLYCEROLS OF FISH OIL: STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES, Chebotarev S. A., Gureeva M. D., Samuseva Y.V., Zelikina D. V., Makasa Akwebiwa J., Antipova A. S., Martirosova E. I., Semenova M. G.	540
21. КОНТРОЛЬ ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА СПИРТНЫХ НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ ВЫДЕРЖАННЫХ ЗЕРНОВЫХ ДИСТИЛЛЯТОВ, Абрамова И.М., Медриш М.Э., Савельева В.Б., Матросова Н.В., Павленко С.В.	541
CONTROL OF AUTHENTICITY AND QUALITY OF ALCOHOLIC BEVERAGES ON THE BASIS OF AGED GRAIN DISTILLATES, Abramova I.M., Medrish M.E., Savelyeva V.B., Matrosova N.V., Pavlenko S.V.	543
22. МИКРОБНАЯ ПРОТЕИНИЗАЦИЯ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО СЫРЬЯ: РЕАЛЬНОСТЬ И ВОЗМОЖНОСТИ, Борисенко Е.Г., Родригес Веласкес Индра, Пироговская Е.К., Маслова Т.А., Азанова А.А.	544
MICROBIAL PROTEINIZATION OF AGRICULTURAL RAW MATERIALS: OPPORTUNITIES AND REALITY, Borisenko EG, Rodriguez Velazquez Indra, Pirogovskaya EK, Maslova TA, Azanova AA.	545
23. МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПОРИСТЫЙ КУКУРУЗНЫЙ КРАХМАЛ: ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, Папахин А.А., Бородин З.М.	546
MODIFIED POROUS CORN STARCH: OBTAINING AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES, Papakhin A.A., Borodina Z.M.	547
24. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА МОЛОЗИВА, Асафов В.А., Харитонов В.Д., Танькова Н.Л., Курченко В.П., Головач Т.Н.	548
SOME ASPECTS OF COLOSTRUM MICROBIOLOGICAL COMPOSITION REGULATION, Asafov V.A., Khartitonov V.D., Tankova N.L., Kurchenko V.P. , Golovatch T.N.	549

25. МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ – ПРОДУЦЕНТЫ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ, Серых И.Н., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Шаненко Е.Ф., Ганина В.И.	549
DAIRY BACTERIA - PRODUCERS OF NEUROMEDIATORS, Serykh I.N., Nikolaev Yu.A., El-Registan G.I., Shanenko E.F., Ganina V.I.	550
26. МУЛЬКОМПОНЕНТНЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ СО СБАЛАНСИРОВАННЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ, Колпакова В.В., Гайворонская И.С.	551
MULTI-COMPONENT PROTEIN COMPOSITIONS BASED ON PLANT PROTEINS WITH BALANCED AMINO ACID COMPOSITION, Kolpakova V.V., Gaivoronskaya I.S.	553
27. О ПРИМЕНЕНИИ АНТИБИОТИКОВ В СПИРТОВОМ ПРОИЗВОДСТВЕ И МЕТОДАХ ИХ КОНТРОЛЯ В ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ, Туршатов М.В., Соловьев А.О., Леденев В.П., Кривченко В.А.	554
ABOUT THE USE OF ANTIBIOTICS IN ALCOHOL PRODUCTION AND THE METHODS OF THEIR CONTROL IN THE FINISHED PRODUCT, Turshatov M.V., Solovyov A.O., Ledenev V.P., Krivchenko V.A.	555
28. ОТХОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ КУКУРУЗЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ, Волкова Г.С., Куксова Е.В., Лакоза О.С., Серба Е.М.	556
WASTE FROM THE PROCESSING OF CORN AS A BASIS FOR THE PRODUCTION OF PROTEIN FEED ADDITIVES WITH PROBIOTIC PROPERTIES, Volkova G. S., Kuksova E. V., Lakoza O.S., Serba E. M.	557
29. ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕКСНЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ, Мирзаев М.Н., Мельницкая Т.И., Мирзаева К.М., Зверьков Д.А.	558
RECEIVING THE COMPONENTS OF COMPLEX FOOD ADDITIVES BASED ON MELANINES AND ORGANIC ACIDS, Mirzaev M.N., Melnitskaya T.I., Mirzaeva K.M., Zverkov D.A.	559
30. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОЭНЗИМА Q10 С ПОСЛЕДУЮЩИМ ОБОГАЩЕНИЕМ КИСЛОМОЛОЧНОГО НАПИТКА НА ОСНОВЕ ЗАКВАСКИ БИФИДОБАКТЕРИЙ, Морозова О.В., Забодалова Л.А.	559
OBTAINING A LIPOSOMAL FORM OF COENZYME Q10 WITH THE SUBSEQUENT ENRICHMENT OF A FERMENTED MILK DRINK BASED ON THE FERMENT OF BIFIDOBACTERIA, Morozova O.V., Zabodalova L.A.	560
31. ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО ШТАММА TRICHODERMA REESEI С УВЕЛИЧЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ КСИЛАНАЗЫ И ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ, Костылева Е.В., Цурикова Н.В., Серeda А.С., Великорецкая И.А., Айсина А.М.	561
OBTAINING A NEW TRICHODERMA REESEI STRAIN WITH INCREASED XYLANASE AND ENDOGLUCANASE ACTIVITY FOR GRAIN RAW MATERIALS TREATMENT, Kostyleva E.V., Tsurikova N.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Aisina A.M. ...	562
32. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА АСТАЦИНА ДЛЯ ОБРАБОТКИ МЯСА, М.Ю. Минаев, А.А. Махова.	563
PRODUCTION OF RECOMBINANT ENZYME ASTACIN FOR MEAT PROCESSING, M.Yu. Minaev, A.A. Makhova	564
33. ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА ПРОДУКТА ОБЩЕСТВЕННОГО ПИТАНИЯ, Иванова Л.А., Голидонова К.А., Чурмасова Л.А.	565
THE USE OF COMPLEX ENZYME PREPARATION TO IMPROVE THE QUALITY OF THE PRODUCT CATERING, Ivanova L. A., Golidonova K. A., Churmasova L. A.	566
34. РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ НОВЫХ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ ЯГОДНОГО И МИКРОБНОГО СЫРЬЯ, Волкова Г.С., Серба Е.М., Соколова Е.Н., Фурсова Н.А., Погоржельская Н.С.	567
BIOTECHNOLOGY DEVELOPMENT OF NEW FOOD INGREDIENTS BASED ON BERRY AND MICROBIAL RAW MATERIALS, Volkova G. S., Serba E. M., Sokolova E. N., Fursova N.A., Pogorzhelskaya N.S.	568
35. РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ ФТОРХИНОЛОНОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, Рязанов А.А., Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Шанин И.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.	569
DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR RAPID DETECTION OF FLUOROQUINOLONES IN FOOD PRODUCTS, Ryazanov A.A., Zvereva E.A., Hendricson O.D., Shanin I.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.	570
36. РАЗРАБОТКА НАУЧНЫХ ОСНОВ НАПРАВЛЕННОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК РАСТИТЕЛЬНОГО И МИКРОБНОГО СЫРЬЯ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ, Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Курбатова Е.И., Фурсова Н.А., Юраскина Т.В., Волкова Г.С.	570
DEVELOPMENT OF SCIENTIFIC BASES OF DIRECTION ENZYMATIC DEGRADATION OF CELL WALLS OF PLANT AND MICROBIAL RAW MATERIALS FOR CREATION BIOTECHNOLOGY OF FOOD INGREDIENTS, Sokolova E.N., Borshcheva Yu.A., Kurbatova E.I., Fursova N.A., Yuraskina T.V., Volkova G.S.	571

37. РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЕПТИДАЗА AEROMONAS SALMONICIDA – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТ ДЛЯ ТЕНДЕРИЗАЦИИ МЯСА, Минаев М.Ю., Махова А.А.	572
RECOMBINANT PEPTIDASE OF M9 FAMILY AS A PERSPECTIVE ENZYME FOR MEAT TENDERIZATION, M.Yu. Minaev, A.A. Makhova	573
38. СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБИОТЫ В РЕСПУБЛИКЕ СЕВЕРНАЯ ОСЕТИЯ-АЛАНИЯ, Цугкиев Б.Г., Соловьева Ю.В., Кабисов Р.Г., Хозиев А.М., Рамонова Э.В., Петрукович А.Г., Цугкиева В.Б.	574
SYSTEMATIC VARIETY OF MICROBIOTA IN REPUBLIC OF NORTH OSSETIA -ALANIA, B.G. Tsugkiev, Y.V. Solovyova, R.G. Kabisov, R.G. Hoziev, E.V. Ramonova, A.G. Petrukovich, V.B. Tsugkieva	575
39. СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД К КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ МОЛЛЮСКОВ И ПРОДВИЖЕНИЮ ПРОДУКЦИИ НА ИХ ОСНОВЕ (ПРОБЛЕМАТИКА РЕСПУБЛИКИ КРЫМ), Битютская О. Е., Багаева Т. Л., Серёгин С. С.	576
SYSTEMIC APPROACH TO THE COMPREHENSIVE PROCESSING OF THE MOLLUSKS AND THE ADVANCEMENT OF THE PRODUCTS BASED ON THEM (ISSUES SPECIFIC TO THE CRIMEAN REPUBLIC), Bityutskaya O. E., Bahaeva T. L., Seregin S. S.	577
40. СОЗДАНИЕ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ НАПИТКОВ С УЛУЧШЕННЫМИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ И ПОТРЕБИТЕЛЬСКИМИ СВОЙСТВАМИ, Шаненко Е.Ф., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Мухамеджанова Т.Г., Рындин А.А.	578
CREATION OF FERMENTED BEVERAGES WITH IMPROVED TECHNOLOGICAL AND CONSUMER PROPERTIES, Shanenko EF, Nikolaev Yu.A., El-Registan G.I., Mukhamedzhanova T.G., Ryndin A.A.	579
41. СТРУКТУРНЫЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕНООБРАЗУЮЩИХ СПОСОБНОСТЕЙ КОМПЛЕКСА КАЗЕИНАТА НАТРИЯ С ЛИПОСОМАМИ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА, НАПОЛНЕННЫМИ ОМЕГА-3 -ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТОЙ, Самусева Ю. В., Гуреева М. Д., Чеботарёв С. А., Зеликина Д. В., Makasa Akwebiwa J., Антипова А.С., Мартиросова Е. И., Семёнова М.Г.	580
STRUCTURAL AND THERMODYNAMIC ANALYSIS OF THE FOAMING ABILITIES OF THE COMPLEX OF SODIUM CASEINATE WITH LIPOSOMES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LOADED WITH OMEGA-3 -LINOLENIC ACID, Samuseva Y.V., Gureeva M. D., Chebotarev S. A., Zelikina D. V., Makasa Akwebiwa J., Antipova A. S., Martirosova E. I., Semenova M. G.	581
42. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПИЩЕВЫЕ ИНГРЕДИЕНТЫ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ И ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ: СТРУКТУРА И СВОЙСТВА, Зеликина Д.В., Антипова А.С., Мартиросова Е.И., Пальмина Н.П., Мишарина Т.А., Семёнова М.Г.	582
PHYSIOLOGICALLY FUNCTIONAL FOOD INGREDIENTS BASED ON BIOPOLYMERS AND ESSENTIAL LIPIDS: STRUCTURE AND PROPERTIES, Zelikina D.V., Antipova A.S., Martirosova E.I., Palmina N.P., Misharina T.A., Semenova M.G.	583
43. ЦИФРОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ, Шелехова Н.В., Абрамова И.М., Серба Е.М., Шелехова Т.М., Скворцова Л.И., Полтавская Н.В., Легайдо Ю.В.	583
DIGITAL TECHNOLOGIES IN THE FOOD INDUSTRY, Shelekhova N. V., Abramova I. M., Serba E. M., Shelekhova T. M., Skvortsova L. I., Poltavskaya N. V., Legeido U.V.	584
44. ЭКСПРЕССНЫЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФИКОТОКСИНА МИКРОЦИСТИНА-LR В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.	585
RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TESTS FOR DETERMINATION OF PHYCOTOXIN MICROCYSTIN-LR CONTENT IN FOOD PRODUCTS, Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.	586
45. ЭКСПРЕССНЫЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТОКСИЧНЫХ КОНТАМИНАНТ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ И ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ: РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СКРИНИНГОВЫХ ТЕСТОВ, Жердев А.В., Зверева Е.А., Урусов А.Е., Дзантиев Б.Б.	587
RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC CONTROL OF TOXIC CONTAMINANTS IN AGRICULTURAL AND FOOD PRODUCTS: EXTENDED OPPORTUNITIES OF SCREENING TESTS, Zherdev A.V., Zvereva E.A., Urusov A.E., Dzantiev B.B.	588

УДК 663.44

АКТИВАЦИЯ ГИДРОЛАЗ ВОЛНОВЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ

Карпенко Д. В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Российская Федерация
 125080, Москва, Волоколамское шоссе, д. 11
 e-mail: DoKa.65@mail.ru

Проведена обработка звуком слышимого диапазона и/или светом с длинами волн видимого диапазона ферментных препаратов амилазного и протеолитического типа действия. Установлено, что волновые воздействия могут как снижать, так и повышать активность гидролаз в зависимости от частоты звука/длины волны света. Активирующий эффект подтвержден при использовании микробных амилаз при лабораторном затирании.

Ключевые слова: микробные амилазы и протеазы, активация ферментов, обработка светом и/или звуком

Применение ферментных препаратов, в том числе, гидролитического типа действия, становится все более широко применяемым технологическим приемом в пищевых, в том числе, бродильных производствах. Он позволяет интенсифицировать производственные процессы, повысить качество, а в ряде случаев, и безопасность готовой продукции. Важным фактором, определяющим эффективность применения ферментных препаратов, является активность их целевых ферментов. Её повышение должно быть обеспечено способами, не ухудшающими свойства полупродуктов и, следовательно, готовой продукции пищевых производств.

В качестве одного из таких способов было изучено влияние на активность гидролаз различных типов действия обработки звуком слышимого диапазона и светом видимого диапазона. Такой прием может быть реализован без использования дорогостоящего оборудования, он не приводит к значимому изменению химического состава технологических сред, безопасен для промышленного оборудования. В наших исследованиях волновым воздействиям подвергали микробные препараты амилазного (АПСубтилин П, Амилогоризин П10х, Термамил SC) и протеолитического (Нейтраза 1,5 MG) типа действия. Опытные образцы ферментных препаратов подвергали воздействию света или звука в течение 60 мин при температуре 22-25° С.

После этого оценивали ферментативную активность ферментов по количеству гидролизованного субстрата (для амилаз - 1 %-ного раствора растворимого крахмала). В качестве контроля в каждом отдельном эксперименте серии использовали образец такого же состава, как и опытный: 10 см³ субстрата + 5 см³ раствора ферментного препарата Амилогоризин П10х, но навеска ферментного препарата, использованная для приготовления раствора, не подвергалась обработке светом/звуком. Кроме того, ставили вариант сравнения, представлявший собой смесь раствора субстрата и дистиллированной воды - он позволял оценить изменения, произошедшие с субстратом в условиях реакции без участия амилаз ферментного препарата. Дозировка ФП составляла в разных сериях экспериментов 0,1 - 0,2 % к массе крахмала в реакционной среде.

Установлено, что волновая обработка может как снижать, так и повышать активность гидролаз в зависимости от длины волны света/частоты звука. Были выявлены их значения, обеспечивающие существенный прирост гидролитической активности ферментов микробного происхождения на 20 - 500 % по сравнению с контролем, не подвергавшимся воздействию света или звука. Было высказано предположение, что изменение ферментативной активности обусловлено введением с помощью волнового воздействия дополнительной энергии, приводящей к изменению (улучшению или ухудшению) конформации белковой молекулы биокатализатора.

Фотообработанный образец ферментного препарата Амилогоризин П10х был применен при проведении лабораторного затирания. Это обеспечило увеличение концентраций сухих и редуцирующих веществ на 7 - 23 % по сравнению с контрольными вариантами.

UDC 663.44

HYDROLASES ACTIVATION BY WAVE INFLUENCE

Karpenko D.

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State University of Food Production",
Moscow, Russian Federation
e-mail: DoKa.65@mail.ru*

A processing of enzyme preparations of amylolytic and proteolytic type of action with the sound of audible range and / or light with wavelengths of the visible range has been carried out. It has been established that wave effects can both reduce and increase the activity of hydrolases depending on the sound frequency / wavelength of light. The activating effect is confirmed when using microbial amylases during mashing of laboratory scale.

Key words: microbial amylases and proteases, activation of enzymes, treatment by light and / or sound

The use of enzyme preparations, including those of hydrolytic type of action, is becoming more and more widely used technological method in food industry, including fermentation productions. It allows to intensify industrial processes, to improve the quality, and in some cases, the safety of the finished products. The important factor determining the effectiveness of the use of enzyme preparations is the activity of its telic enzymes. Its increase should be provided by methods that don't impair the properties of semi-products and, as the consequence, of food industry's finished products.

As one of such methods, the influence of the treatment with audible sound and/or with the light of the visible range on the activity of various types hydrolases was studied. Such treatment can be implemented without the use of expensive equipment, it does not lead to the significant changes in the chemical composition of the technological media, it is safe for industrial equipment. In our studies, microbial enzyme preparations of amylolytic (APSubtilin P, Amylorizin P10x, Termamil SC) and proteolytic (Neutrase 1.5 MG) type of action were subjected to wave influence. Samples of enzyme preparations were exposed to light and/or sound for 60 minutes at a temperature of 22-25° C.

After that, the enzymatic activity of enzymes was evaluated by the amount of hydrolyzed substrate (for amylases - 1% solution of soluble starch). A specimen of the same composition as the experimental one was used as the control in each individual experiment of the series: 10 cm³ of substrate + 5 cm³ of the enzyme preparation Amylorizin P10x solution, but the sample of the enzyme preparation used for the preparation of the solution was not subjected to light / sound processing. In addition, a "blank" specimen was used, which was a mixture of the substrate solution and distilled water - it allowed to evaluate the changes that occurred with the substrate under the reaction conditions without the participation of amylases of enzyme preparation. The dosage of enzyme preparation in different series of experiments was equal to 0.1–0.2% by weight of starch in the reaction medium.

It was found that wave processing can both reduce and increase the activity of hydrolases depending on the wavelength of the light / sound frequency. Its values were revealed, providing a substantial increase in the hydrolytic activity of enzymes of microbial origin by 20–500 % compared with controls that were not exposed to light or sound. It was suggested that the changes of enzyme activity are due to the introduction of additional energy with by mean of wave treatment, which leads to a change (improvement or degradation) in the conformation of the protein molecule of a biocatalyst.

A photo-processed sample of the enzyme preparation Amylorizin P10x was applied for the laboratory scale mashing. It provided the increase in the concentrations of dry and reducing substances by 7–23% compared with the control variants.

УДК 573.6.086.83

БИОДОБАВКА ИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В ПРОДУКТАХ ГЕРОДИЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

Красуля О.Н., Юшина Е.А., Богуш В.И., Батурин С. И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия
125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом. 11
e-mail: mgupp@mgupp.ru

Применение препарата из биомассы микромицета *Mortierella sarnyensis* позволяет получить продукт для геродиетического питания, имеющий повышенное содержание легкоусвояемых кальция и фосфора, а также питательные вещества в более доступной форме

Ключевые слова: геродиетическое питание, микромицет *Mortierella sarnyensis*, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), ферментоллизат отходов разделки рыбы

Согласно данным Министерства здравоохранения РФ продолжительность жизни населения России в среднем составляет 70 лет, что значительно ниже, чем в экономически развитых странах. При этом питание является практически единственным средством, пролонгирующим продолжительность жизни на 25-40%.

Сокращение продолжительности жизни, рост сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, увеличение количества людей с избыточной массой тела ученые связывают с нарушением пищевого статуса, с недостатками в питании полноценного по аминокислотному составу белка, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов, макро- и микроэлементов.

Рационы для людей пожилого и преклонного возраста должны разрабатываться с учетом их физиологических потребностей и содержать, помимо макронутриентов (белков, жиров, углеводов), обеспечивающих калорийность пищи, целый ряд микронутриентов (витамины, минеральные вещества, пищевые волокна и др.), необходимых для нормального функционирования организма.

Использование рыбных отходов, являющихся источником ценных белковых, липидных и минеральных веществ и совмещение их с геропротекторами, иммуномодуляторами и антиоксидантами в рецептурах, позволит получить новые функциональные продукты для питания людей старшего возраста.

Перспективными продуцентами липидов, в том числе полиненасыщенных жирных кислот, в последние годы считаются микроорганизмы, в частности, микроскопические грибы.

Некоторые из них синтезируют и накапливают в клетках до 70% липидов, до 50% из них составляют ПНЖК.

Препарат из биомассы микромицета *Mortierella sarnyensis* получают следующим образом.

Сухую биомассу микроорганизма *Mortierella sarnyensis* экстрагируют неполярным экстрагентом, например, двуокисью углерода или гексаном, в надкритическом состоянии. На этой стадии отделяют первый экстракт, используемый в дальнейшем при получении препарата. Далее биомассу последовательно экстрагируют водой, щелочью, водой, кислотой, водой, щелочью и водой. Полученный после завершения всех перечисленных стадий экстрагирования твердый остаток сушат и объединяют с первым экстрактом.

Отходы разделки рыбы подвергают ферментоллизу комплексом протеолитических ферментов и сушат ферментоллизат. Отходы разделки рыбы подвергают кислотному гидролизу минеральной кислотой, например, соляной, и сушат гидролизат.

Сухие растительные компоненты, ферментоллизат и кислотный гидролизат отходов разделки рыбы, поваренную соль просеивают и пропускают через магнитный уловитель. CO₂-экстракты укропа и сельдерея, рапсовое масло фильтруют. Далее готовят рецептурную смесь и фасуют ее, например, в упаковку из комбинированного материала.

В рецептурную смесь входят компоненты (мас.ч):

ферментоллизат отходов разделки рыбы – 20

соевый текстурат – 17

капуста – 13

томаты – 18

мука из фасоли – 5,5

лук репчатый – 4,5

морковь – 6,5
крупа сорго – 10
соль поваренная – 1,73
кислотный гидролизат отходов разделки рыбы – 2,67
CO₂-экстракт укропа – 0,06
CO₂-экстракт сельдерея – 0,04
рапсовое масло – 1
препарат из биомассы микроорганизма *Mortierella sarnyensis* – 0,1

Целевой продукт перед употреблением восстанавливают кипятком. После восстановления продукт представляет собой первое обеденное блюдо с органолептическими свойствами, близкими к ухе.

Химический состав полученного продукта близок к рекомендуемому для геродиетического питания.

Повышение усвояемости подтверждено опытным путем. При культивировании тест-микроорганизма *Tetrachimena stilonichia* в течение 36 часов при температуре 28°C накопление биомассы на продукте, полученном данным способом, по сравнению с наиболее близким аналогом было больше на 12%.

Новый продукт является органолептически привлекательным, функциональным по содержанию ценных для пожилых людей ингредиентов: фосфора, кальция и витаминов.

Литература:

1. 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
2. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г. и др. Исследование синтеза арахидоновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахидоновой кислоты// *Микробиология*. 1996.- Т.65, вып.1.- с. 31-36
3. Касьянов Г.И., Запорожский А.А., Юдина С.Б. Технология продуктов питания для людей пожилого и преклонного возраста.- Ростов-на-Дону:Изд.центр «МарТ», 2001.-192 с.
4. Тутельян В.А., Вялков А.И., Разумов А.Н. и др. Научные основы здорового питания: – М.: Издательский дом «Панорама», 2010.- 816с.

УДК 573.6.086.83

BIOSUPPLEMENT FROM MICROSCOPIC FUNGUS IN ELDERLY NUTRITION PRODUCTS

Krasulya O. N., Yushina E. A., Bogush V. I., Baturin S. I.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Moscow State University of Food Production,
Moscow, Russia
125080, Moscow, Volokolamskoe highway,11
e-mail: mgupp@mgupp.ru

Practical using of *Mortierella sarnyensis* micromycete biomass allows to receive an elderly nutrition product, that has high content of easily digestible calcium and phosphorus, and also has more accessible forms of nutritive materials.

Key words: elderly nutrition, *Mortierella sarnyensis* micromycete, polyunsaturated fatty acids (PUFA), fermentolysat of fish waste

According to materials of Ministry of health of Russian Federation, lifespan in Russia averaged 70 years, and this is much lower than in economically advanced countries. In fact nutrition is nearly only way to prolong lifespan for 25-40%.

Scientists connect reducing of lifespan, increasing in cardiovascular and oncological diseases, and growth of quantity of obese people with eating disorders, nutritional deficiency of complete proteins, PUFAs, vitamins, micro- and macro-elements.

Diets for elderly people must be tailored to physiological needs and contain not only macronutrients (proteins, fats, carbohydrates), that provide calorific value of food, but also micronutrients (vitamins, mineral substances, food fibers etc.), that are necessary for normal functioning of organism.

Using of fish wastes, that are sources of valuable protein, lipid and mineral substances and connecting them with gero-protectives, immunomodulators, antioxidants can provide new functional products for nutrition of elderly people.

In recent years, the most promising sources of fat, including PUFAs, are considered microorganisms, in particular microscopic fungus.

Some of them syntheses and accumulate to 70 % lipids in cells, to 50% of fats are PUFAs.

Preparations from *Mortierella sarnyensis* myceta biomass are made in this way: dry *Mortierella sarnyensis* biomass extract by non-polar extractant, for example by CO₂ or hexane in supercritical state. In this stage separate the first extract, that are used further in producing of preparation. After that biomass consistently extracted by water, alkali, water, acid, water, alkali and water in the end. After all received hard substance make dry and combine with the first extract.

Fish wastes are fermenting by complex of proteolytic enzymes and dry received fermentolysat. Fish wastes subjected to acid hydrolysis by mineral acids such as hydrochloric acid and than dry.

Dry herbal components, fermentolysat and acid hydrolysate of fish wastes, salt sift and skip through the magnetic catcher. Filter CO₂ – extracts of dill and celery, rapeseed oil. Then make prescription mixture and package this, for example, in combined materials package.

Prescription mixture consists of (parts):

Fish waste fermentolysat – 20

Soybean's texturate – 17

Cabbage – 13

Tomatoes – 18

Bean flour – 5,5

Onion – 4,5

Carrots – 6,5

Sorghum croup – 10

Salt – 1,73

Acid hydrolysate of fish wastes – 2,67

CO₂ – extracts of dill – 0,06

CO₂ – extracts of celery – 0,04

Rapeseed oil – 1

Preparation from *Mortierella sarnyensis* myceta biomass – 0,1

This product should be restored with boiled water. After restoring this product looks like the first dinner dish (soup) with organoleptic qualities similar to fish soup.

Chemical composition of this product is close to recommended for elderly nutrition.

Improvement of nutrient-use efficiency is empirically demonstrated. During the cultivation the testing *Tetrachimena stilonichia* microorganism for 36 hours with temperature 28°C degrees, the increasing of weight of biomass was 12% more than nearest analogue.

New product is attractive by organoleptic qualities, functional by content of value ingredients for elderly people: phosphorus, calcium and vitamins.

References:

1. 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
2. Eroshin V.K., Deduhina E.G. and etc. Study of the synthesis of arachidonic acid by the fungus of the genus *Mortierella*: a microbiological method of selection of arachidonic acid producers // Microbiology. 1996. T.65, issue 1...- p. 31-36
3. Kasyanov G.I., Zaporozhsky A.A., Yudina S.B. Technology of food for the elderly and elderly. Rostov-on-Don: Mart, 2001. - 192 p.
4. Tutelyan V.A., Vyalkov A.I., Razumov A.N. et al. Scientific bases of healthy nutrition: - М.: Panorama Publishing House, 2010. - 816p

УДК 66.099.5: 664.8 (043.2)

БИОКАТАЛИЗ КАК ИНСТРУМЕНТАРИЙ В ТЕХНОЛОГИЯХ ЯГОДНЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

Алексеев Е.В.

ФГБОУ ВО Московский Государственный Университет Пищевых Производств, Москва, Россия
125080 Москва, Волоколамское ш.д.11
e-mail: elealekseenk@rambler.ru

Экспериментально обоснована целесообразность проведения ферментативной предобработки мезги ягод при получении ягодных полуфабрикатов, обеспечивающей увеличение выхода соковой фракции, повышение ее антиоксидантной активности и наиболее полное извлечение и перевод в биодоступную форму биологически активных и минорных компонентов ягод.

Ключевые слова: брусника, клюква, красная смородина, облепиха, ферментативная обработка, выход сока, биологически активные вещества, антиоксидантная активность, комплексообразующая способность

Успешно развивающимся направлением в переработке ягодного сырья является получение технологичных ягодных полуфабрикатов в форме соковых концентратов и порошковых продуктов, потребительские критерии которых отражают достоинства свежих ягод – натуральность цвета, естественность вкуса, аромата и характеризуются высокой концентрацией биологически активных веществ (БАВ) исходного сырья [1,2]. Поэтому современные технологии переработки ягод должны быть ориентированы на сохранность и наиболее полное использование широкого спектра природных компонентов ягод. Значимую роль в этом контексте призваны сыграть ферментные препараты (ФП), применение которых на стадии предварительной обработки ягод, способствует повышению экстрактивной способности растительной ткани и обогащению соковой фракции дополнительными количествами природных компонентов ягод, которые, находясь в растворимой форме, способны легко ассимилироваться организмом человека и проявлять свою физиологическую активность, а также формировать специфическую палитру цвета, вкуса и аромата [3].

Разработаны условия предобработки ягод красной смородины, облепихи, брусники, клюквы с использованием композиций ФП пектолитического (Фруктоцим-Колор, Фруктоцим П-6Л, PectinexXXL, Рапидаза CR) и глюканолитического действия (Laminex BG Glucanase Complex, Ксибитен-Цел, Laminex BG2, Брюзайм BGX), способствующие увеличению выхода сока на 18-40%, существенному повышению экстрактивной способности растительной ткани и переводу в сок значительной части БАВ ягод, натуральных красителей, консервантов и антиоксидантов: витамина С (в 1,4-1,8 раза), биоактивных полифенольных соединений (в 1,2-2,9 раза), антоцианов (в 1,2-2,5 раза), катехинов – в 1,1-1,7 раза, проантоцианидинов – в 1,3-2,0 раза, флавонов, флавонолов, флаванололов – (в 4,4-4,5 раза), каротиноидов (в пересчете на β -каротин) (в 3,2 раза), токоферолов (в 2,5 раза), органических кислот (в 1,3-1,7 раза) по сравнению с соком, полученным без ферментативной предобработки. Применение ФП способствует более глубокой трансформации природного сырья, о чем свидетельствуют данные хроматографических исследований. Так, в составе катехинов соковой фракции мезги ягод брусники дополнительно идентифицирован эпигаллокатехин, сока облепихи – эпикатехингаллат, в составе антоциановых соединений сока красной смородины – цианидин-3-софорозид, а в наборе каротиноидов облепихового сока выявлены лютеин и криптоксантин, присутствия которых в соковых фракциях, полученных без применения ФП, обнаружено не было. Выявлена более высокая антиоксидантная активность соковых фракций, полученных после ферментативной обработки (в 1,3-4,3 р.) и высокая комплексообразующая способность по отношению к свинцу (Рb).

Разработаны технологические решения для получения соковых концентратов и порошковых продуктов на основе ферментативно обработанной мезги ягод как перспективных ягодных полуфабрикатов с высоким содержанием функциональных пищевых ингредиентов, природных красителей, антиоксидантов и консервантов в ориентации на применение при получении нового ассортимента пищевых продуктов.

Литература:

1. Семенов Г.В. Вакуумная сублимационная сушка. – М.: ДеЛи плюс, 2013. – 264 с
2. Шобингер У. Фруктовые и овощные соки: научные основы и технологии / пер. с нем. под общим науч. ред. А.Ю. Колеснова, Н.Ф. Берестеня и А.В. Орещенко. – СПб: Профессия, 2004. – 640 с.
3. Иванова Л.А., Войно Л.И., Иванова И.С. Пищевая биотехнология. Кн. 2. Переработка растительного сырья / Под ред. И.М. Грачевой. – М: КолосС, 2008. – 472 с.

УДК 66.099.5: 664.8 (043.2)

BIOCATALYSIS AS A TOOL IN TECHNOLOGY OF BERRY SEMI-FINISHED PRODUCTS

Alekseenko E.V.

Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia
125080 Moscow, Volokolamskoye shosse, 11
e-mail: elealekseenk@rambler.ru

The feasibility of the enzymatic pretreatment of berry pulp in the production of berry semi-finished products, providing an increase in the yield of juice fraction, increasing its antioxidant activity and the most complete extraction and transfer to the bioavailable form of biologically active and minor components of berries has been experimentally proved.

Key words: cranberries, bilberries, red currant, sea buckthorn, enzymatic treatment, juice yield, biologically active substances, antioxidant activity, complexing ability

Successfully developing direction in the processing of berry raw materials is to obtain technological berry semi-finished products in the form of juice concentrates and powder products. Its consumer criteria reflect the advantages of fresh berries - natural color, taste, aroma and are characterized by a high concentration of biologically active substances (BAS) of raw materials [1,2]. Therefore, modern technologies of processing of berries should be focused on the conservation and the most complete use of a wide range of berry natural components. A significant role in this context should be played by enzyme preparations (EP). Its application at the stage of pretreatment of berries, enhances the extractive ability of plant tissue and enriching the juice fraction with additional amounts of natural components of berries, which, being in a soluble form, are able to easily assimilate by the human body and demonstrate their physiological activity, as well as to form a specific palette of color, taste and aroma [3].

The pretreatment conditions of the berries of red currant, sea buckthorn, bilberry, cranberry, using the compositions of pectolytic EP (Fructocym-Kolor, Fructocym P-6L, Pectinex XXL, Rapidaze CR) and glucanolytic EP (Laminex BG Glucanase Complex, Ksybitten-Cel, Laminex BG2, Bryzaim BGX), contributing to an increase of juice yield 18-40%, a significant increase in extractive ability of the plant tissue and transfer to the juice a significant part of biologically active substances of berries, natural dyes, preservatives, and antioxidants have been developed. It was found the increasing of extraction into the juice the biologically active and minor components of berries such as vitamin C (1.4-1.8 times), bioactive polyphenolic compounds (1.2-2.9 times), anthocyanins (1.2-2.5 times), catechins (1.1-1.7 times), proanthocyanidins (1.3-2.0 times), flavones, flavonols - (4.4-4.5 times), carotenoids (in terms of β -carotene) (3.2 times), tocopherols (2.5 times), organic acids (1.3-1.7 times) compared with juice obtained without enzymatic pretreatment. The application of EP contributes to a deeper transformation of natural raw materials, as evidenced by the data of chromatographic researches. Thus, in the catechin composition in the juice fractions of the cranberries pulp are additionally identified epigallocatechin, juice of sea buckthorn – epicatechingallate, in the composition of anthocyanin compounds of red currant juice – cyanidin-3-sophoroside, and in the set of carotenoids of sea buckthorn juice identified lutein and kryptoxanthin, which presence in the juice fractions obtained without the use of EP were not found. Higher antioxidant activity of juice fractions obtained after enzymatic treatment (in 1,3-4,3 p.) and high complexing ability to lead (Pb) have been revealed.

Technological solutions for the production of juice concentrates and powder products based on enzymatically processed berry pulp as prospective berry semi-finished products with a high content of functional food ingredients, natural dyes, antioxidants and preservatives for the application in the production of a new range of food products have been developed.

References:

1. Semenov G.V. *Vakuumnaya sublimacionnaya sushka*. – M.: DeLiplyus, 2013. – 264 s
2. SHobinger U. *Fruktovye i ovoshchnye soki: nauchnye osnovy i tekhnologii / per. s nem. pod obshchim nauch. red. A.YU. Kolesnova, N.F. Berestenyai A.V. Oreshchenko*. – SPb: Professiya, 2004. – 640 s.
3. Ivanova L.A., Vojno L.I., Ivanova I.S. *Pishchevaya biotekhnologiya. Kn. 2. Pererabotka rastitel'nogo syr'ya / Pod red. I.M. Grachevoj*. – M: KolosS, 2008. – 472

УДК 543.866

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИДЕНТИФИКАЦИИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Серба Е.М., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Таджибова П.Ю., Кузнецова Н.А., 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, д. 4-Б
 e-mail: serbae@mail.ru

На основе систематизации и актуализации данных по составу, субстратной специфичности и уровню активности гидролаз в ферментных препаратах для пищевой промышленности сформирована база данных по целевым ферментным системам для биокаталитической конверсии животного, микробного и растительного сырья.

Ключевые слова: биокатализ, пищевые ингредиенты, ферментные препараты, активность, методы

Одним из ключевых факторов в пищевых технологиях являются ферментные препараты, различающиеся по субстратной специфичности и механизму действия. Ферментативный катализ обеспечивает радикальное изменение функциональных свойств и фракционного состава сельскохозяйственного сырья на различных этапах его переработки, расширяет возможности совершенствования традиционных пищевых технологий, а также создания новых видов специализированной продукции [1].

В результате выявленных закономерностей процессов биокатализа подобраны ферментные препараты (ФП) целевого назначения для гидролиза полимеров растительных, животных и микробных субстратов, обеспечивающие повышение эффективности биотехнологических процессов в перерабатывающих отраслях, создание биологически полноценных пищевых продуктов и напитков, пищевых ингредиентов, белково-аминокислотных и биологически активных добавок [2, 3].

В основу теоретического обоснования подбора ферментной системы положены знания о составе сырья и наличии в нем субстратов для биокаталитического действия ферментов, а также прогнозируемые результаты о заданной степени деструкции и предполагаемом составе продуктов гидролиза. Наиболее широко в пищевой промышленности используются протеазы, α -амилазы, глюкоамилазы, гемицеллюлазы и пектиназы.

Наличие в настоящее время новых концентрированных ферментных препаратов, применяемых в перерабатывающих отраслях пищевой промышленности, существенное изменение их физико-химических характеристик привело к созданию современных методик определения их активности. С целью установления единых требований к методам определения активности ферментных препаратов и обеспечения получения достоверных результатов усовершенствованы существующие методы анализа и на их основе разработаны 6 национальных стандартов и 2 межгосударственных стандарта.

Используя эти методы, осуществляется контроль качества ферментных препаратов для пищевой промышленности, проводится их идентификация по субстратной специфичности и разрабатываются нормы их расхода для биокаталитической конверсии полимеров сельскохозяйственного сырья.

Результаты систематизации экспериментальных данных по составу и уровню активности гидролаз в ФП микробного происхождения позволили сформировать базу данных по целевым ферментным системам для конверсии животного, микробного и растительного сырья в производстве пищевой продукции.

Исследования проведены в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 г.г. (тема № 0529-2019-0066).

Литература:

1. Аксенова Л.М., Римарева Л.В. Направленная конверсия белковых модулей пищевых продуктов животного и растительного происхождения // Вестник российской академии наук. – 2017. – Т. 87. - № 4 - С. 355–357.
2. Агаркова Е.Ю., Березкина К.А., Кручинин А.Г., Николаев И.В. Проектирование протеолиза молочных белков для создания функциональных продуктов со сниженной аллергенностью // Материалы Международной научной конференции «Пищевые инновации и биотехнологии». – Кемерово: ФГБОУ ВПО «КемТИПП». – 2014. – С. 21-23.
3. Соколова Е.Н., Курбатова Е.И., Римарева Л.В., Давыдкина В.Е., Борщева Ю.А. Биотехнологические аспекты направленной ферментативной деструкции клеточных стенок растительного сырья для получения экстрактов с повышенным содержанием биологически ценных веществ в качестве компонентов функциональных напитков // Вопросы питания. – 2016. – Т.85. - № 2. – С. 151-152.

UDK 543.866

BIOCATALYTIC PROCESSES IN THE FOOD INDUSTRY AND MODERN APPROACHES OF THE IDENTIFICATION OF ENZYME PREPARATIONS

Serba E.M., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Tadzhibova P.Y., Kuznecova N.A., Rimareva L.V.

All-Russian 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

Based on the systematization and updating of data on the composition, substrate specificity and level of activity of hydrolases in enzyme preparations for the food industry, a database of target enzyme systems for biocatalytic conversion of animal, microbial, and plant materials has been formed.

Key words: biocatalysis, food ingredients, enzyme preparations, activity, methods

One of the key factors in food technology are enzyme preparations that differ in substrate specificity and mechanism of action. Enzymatic catalysis provides a radical change in the functional properties and fractional composition of agricultural raw materials at various stages of its processing, expands the possibilities of improving traditional food technologies, as well as creating new types of specialized products [1].

As a result of the identified patterns of biocatalysis processes, enzyme preparations (EP) of a special purpose were selected for the hydrolysis of polymers of plant, animal, and microbial substrates, which increase the efficiency of biotechnological processes in the processing industries, create biologically complete food products and beverages, food ingredients, protein-amino acid and biologically active additives [2, 3].

The theoretical basis for the selection of the enzyme system is based on knowledge of the composition of the raw material and the presence of substrates for the biocatalytic action of enzymes, as well as the predicted results of a given degree of destruction and the expected composition of the hydrolysis products. The most widely used in the food industry are proteases, α -amylases, glucoamylases, hemicellulases and pectinases.

The presence at present of new concentrated enzyme preparations used in the processing industries of the food industry, a significant change in their physico-chemical characteristics has led to the creation of modern methods for determining their activity. In order to establish uniform requirements for methods for determining the activity of enzyme preparations and to ensure reliable results, existing methods of analysis have been improved, and 6 national standards and 2 intergovernmental standards have been developed on their basis.

Using these methods, the quality control of enzyme preparations for the food industry is carried out, they are identified by substrate specificity and their consumption rates for the biocatalytic conversion of polymers of agricultural raw materials are developed.

The results of systematization of experimental data on the composition and level of activity of hydrolases in EP of microbial origin made it possible to form a database of target enzyme systems for the conversion of animal, microbial, and vegetable raw materials in food production.

The studies were carried out within the framework of the Program of Basic Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2013-2020 (topic number 0529-2019-0066).

References:

1. Aksenova L.M., Rimareva L.V. Directional conversion of protein modules of food products of animal and vegetable origin // *Vestnik Rossiiskoi Akademii Nauk*. 2017. T.87. № 4. P. 355–357.
2. Agarkova E.Yu., Berezkina K.A., Kruchinin A.G., Nikolaev I.V. Designing the proteolysis of milk proteins to create functional products with reduced allergenicity // *Proceedings of the International Scientific Conference "Food Innovation and Biotechnology"*. Kemerovo: KemTIPP. 2014. P. 21-23.
3. Sokolova E.N., Kurbatova E.I., Rimareva L.V., Davydina V.E., Borshcheva Yu.A. Biotechnological aspects of the directed enzymatic destruction of the cell walls of plant materials to obtain extracts with a high content of biologically valuable substances as components of functional drinks // *Nutrition issues*. 2017. T. 85. № 2. P. 151-152.

УДК 573.6.086.835:633/635

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА К ПИЩЕ – БИОПЕКТИН

Бутова С.Н., Музыка М.Ю., Николаева Ю.В.

Федеральное государственное учреждение высшего образования
 «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия
 e-mail: organikamgupp@mail.ru

Получен пектин – биологически активная добавка путем биоконверсии отходов плодово-ягодного сырья. Доказана возможность использования отходов растительного сырья при организации новых современных технологий и создание тем самым безотходного производства.

Ключевые слова: растительное сырье, пектиновые вещества, полисахариды, эмульгатор, эмульсия, реологические характеристики

Накопление вредных веществ в организме человека напрямую связано с несбалансированностью рациона питания. Одним из способов решения данной задачи является производство продуктов с применением пищевых волокон, способствующих выведению из организма ксенобиотиков и оказывающих лечебно-профилактическое действие. С этой целью используют пектины и пектинсодержащие продукты [1].

Биомасса растений является экологически безопасным видом природного растительного сырья и источником получения многих практически полезных веществ, к которым относятся и пектиновые полисахариды [3].

Благодаря природному происхождению и уникальным свойствам пектин и пектинопродукты, не имеющие полноценных заменителей, завоевали прочное место в современной технологии пищевой промышленности и некоторых областях медицины [2].

При закупках сырья для производства пектина определяющими факторами являются процент содержания в сырье пектина и отсутствие тяжелых металлов и пестицидов. Кроме того, необходимо учитывать, что жом во влажном состоянии подвергается действию ферментов и плесеней, которые продуцируют ферменты, производящие деэтерификацию и деградацию пектиновых веществ.

С целью изучения биоpectина были выбраны образцы различных пектинов из плодово-ягодного и овощного сырья. Чистые препараты пектиновых веществ в неизменном состоянии получать достаточно трудно – пектиновые вещества являются комплексной группой кислых полисахаридов, которые могут содержать значительное количество нейтральных сахарных компонентов (L-арабиноза, D-галактоза, D-глюкоза, L-рамноза).

Разработанная в МГУПП технология позволяет получать пектин низкой степени полимеризации и этерификации из разнообразного растительного сырья и отходов его переработки. Такой пектин обладает повышенной биологической активностью, сорбционной емкостью и комплексообразующей способностью, поскольку в нем содержится больше свободных связей и активных центров, взаимодействующих с токсичными веществами, а также с компонентами клеточных мембран. Использование такого пектина в качестве БАД или добавление ее в пищевые продукты увеличивает их функциональные свойства и оказывает общее оздоравливающее воздействие на организм.

Присутствие в пектинах дисахаридов, таких как сахароза, мальтоза, лактоза, а также моносахарида – фруктоза, и витамина С, и б-каротина оказывают активизирующее действие на функцию нервной системы, при перегрузках организма, а также на работу желудочно-кишечного тракта. Наличие в препарате таких клеточных метаболитов как витамины группы С позволяет использовать его для восстановления естественной сопротивляемости ослабленных в результате заболевания или переутомления организма.

В результате проведенной работы был выделен биоpectин из растительного сырья используя комплекс пектолитических ферментов, выделенных и дрожжей. Определены физико-химические, биохимические и органолептические свойства полученных пектинов, содержание моно- и дисахаридов. Изучено бактерицидное действие полученных пектинов, их действие на патогенные микроорганизмы отделяемого гнойных ран доказано в лаборатории Центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора Западного округа г. Москвы. В связи с этим можно исследовать бактериостатическое действие на различных микроорганизмах.

Литература:

1. Василенко Ю.К., Москаленко С.В., Кайшева Н.Ш. Получение и изучение физико-химических и гепатопротекторных свойств пектиновых веществ // Химико-фармацевтический журнал. – 1997. – Т. 31, № 6. – С. 28–29.
2. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Элевар, 2000. – 242 с.
3. Донченко Л.В., Фирсов Г.Г. Пектин: основные свойства и применение. – М.: ДеЛи принт, 2007. – 276 с.

UDC 573.6.086.835:633/635

BIOLOGICAL ACTIVE SUPPLEMENT TO FOOD – BIOPECTIN

Butova S.N., Muzyka M.Yu., Nikolaeva J.V.

Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia
e-mail: organikamgupp@mail.ru

The resulting pectin is a dietary supplement by bioconversion waste fruit and berry raw materials. The possibility of using waste plant materials in the organization of new modern technologies and thereby creating waste-free production has been proven.

Key words: vegetable raw materials, pectin substances, polysaccharides, emulsifier, emulsion, rheological characteristics

The accumulation of harmful substances in the human body is directly related to the imbalance of the diet. One of the ways to solve this problem is the production of products with the use of dietary fibers that promote the removal of xenobiotics from the body and have a therapeutic and prophylactic effect. For this purpose, pectins and pectin containing products are used [1].

Plant biomass is an environmentally safe type of natural plant raw materials and a source of many practically useful substances, which include pectin polysaccharides [3].

Due to their natural origin and unique properties, pectin and pectin products, which do not have full-fledged substitutes, have gained a firm place in modern technology of the food industry and some areas of medicine [2].

When purchasing raw materials for pectin production, the determining factors are the percentage of pectin in the raw material and the absence of heavy metals and pesticides. In addition, it is necessary to take into account that the pulp in the wet state is exposed to the action of enzymes and molds, which produce enzymes that produce deesterification and degradation of pectic substances.

In order to study biopectin, samples of various pectins from fruit and berry and vegetable raw materials were selected. Pure preparations of pectic substances in an unchanged state are difficult to obtain - pectic substances are a complex group of acidic polysaccharides that may contain significant amounts of neutral sugar components (L-arabinose, D-galactose, D-glucose, L-rhamnose).

The technology developed at MGUPP allows to obtain pectin of a low degree of polymerization and esterification from various plant raw materials and waste from its processing. This pectin has a high biological activity, sorption capacity and complexing ability, because it contains more free bonds and active centers that interact with toxic substances, as well as with components of cell membranes. The use of such pectin as a dietary supplement or adding it to food products increases their functional properties and has a general healing effect on the body.

The presence of disaccharides in pectins, such as sucrose, maltose, lactose, as well as monosaccharide - fructose, and vitamin C, and-carotene have an activating effect on the function of the nervous system, during body overload, as well as on the gastrointestinal tract. The presence in the preparation of such cellular metabolites as vitamins of group C allows using it to restore the natural resistance of those weakened as a result of illness or overwork.

As a result of this work, biopectin was isolated from plant raw materials using a complex of pectolytic enzymes isolated from yeast. The physico-chemical, biochemical and organoleptic properties of the pectins obtained, the content of mono- and disaccharides were determined. The bactericidal effect of the obtained pectins was studied, and their effect on pathogenic microorganisms of purulent wounds was proved in the laboratory of the Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Western District of Moscow. In connection with these, it is possible to investigate the bacteriostatic effect on various microorganisms.

References:

1. Vasilenko YU.K., Moskalenko S.V., Kajsheva N.SH. *Poluchenie i izuchenie fiziko-himicheskikh i gepatoprotekturnykh svoystv pektinovykh veshchestv // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal.* – 1997. – T. 31, № 6. – S. 28–29.
2. Gracheva I.M., Krivova A.YU. *Tekhnologiya fermentnykh preparatov.* – M.: EHlevar, 2000. – 242 s.
3. Donchenko L.V., Firsov G.G. *Pektin: osnovnye svoystva i primeneniye.* – M.: DeLi print, 2007. – 276 s.

УДК 637.04:637.03

БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ АНГИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ

Павловская Н.Е., Горькова И.В., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Гуляева К.Н., Костромичева Е.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», г. Орел, Россия
302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, д.69
e-mail: i-gagarina@list.ru

Разработана технология получения функциональных добавок, содержащих вещества ангиопротекторного действия для производства функциональных продуктов и напитков. Технология предусматривает использование отечественного растительного сырья, подобранного с учетом требований к качеству конечных продуктов.

Ключевые слова: функциональные продукты питания, фенольные соединения, рутин

Необходимость применения продуктов функционального питания продиктована возрастающим с каждым годом пищевым дефицитом минорных компонентов, который затрагивает все слои населения. Неоднократно было доказано, что существует самая тесная связь между едой и здоровьем человека, отдельные компоненты могут быть единственной причиной многих патологий. Новые технологические подходы к производству пищи подразумевают целенаправленное влияние на организм. Употребление продуктов, содержащих биологически активные вещества, обладающие ангиопротекторными, антиоксидантными, радиопротекторными, иммуностимулирующими свойствами будет способствовать решению основных вопросов рационального питания и ликвидации нарушений в организме, связанных с недостатком микронутриентов.

К настоящему времени в России подавляющее большинство пищевых ингредиентов импортируется, поэтому организация их производства остается актуальным. Обогащенные и функциональные продукты имеют в своем составе один или несколько компонентов, которые содержатся в них в повышенном количестве. Этими компонентами выступают незаменимые для организма человека вещества - витамины, минералы и другие биологически активные вещества, а также отдельные макронутриенты.

Одним из источников получения биологически активных соединений фенольной природы является гречиха посевная *Fagopyrum esculentum* M. В различных органах гречихи содержатся различные антиоксидантные, ангиопротекторные соединения, такие как флавоноиды и другие фенолы, к которым относятся рутин, кверцетин, кверцитрин, витексин, гиперозид, изовитексин, ориентин, изоориентин, проантоцианидины, фенолкарбоновые и бензойные кислоты, витамины B₁, B₂, и E. Содержание рутина (на абсолютно сухой вес) колеблется в следующих пределах: в листьях от 5 до 55 мг/г (среднее – 18); в цветках от 5 до 50 мг/г (среднее – 20); в стеблях от 0,5 до 30 мг/г (среднее 2,5 – 3). Максимальным процентным содержанием рутина отличались генотипы гречихи: Молва, Антоциановая, Баллада, Дизайн, Деметра, Дружина. Установлено, что содержание отдельных представителей флавоноидов больше в генеративных органах, чем в вегетативных. В плодах по сравнению с цветками их содержание снижено в 4-30 раз. Рутин локализован в основном в цветках и листьях, кверцетин, эпикатехин, хлорогеновая кислота в цветках. А в процессе прорастивания семян количество рутина и кверцетина к седьмым суткам возрастает в 20-25 раз, что актуально в связи с широким использованием проростков гречихи в технологии функциональных продуктов питания и напитков. Обогащение продуктов природными ангиопротекторами улучшает и физико-химические свойства.

Введение в рецептуру мясoproductов биофлавоноидов гречихи в количестве 0,1% на 100 г жира, содержащегося в продукте, приводит к снижению на 47% кислотного, 60% перекисного, 50% тиобарбитурового чисел липидов и увеличивает сроки хранения в 2-3 раза. Разработаны рецептуры и технологии функциональных продуктов питания и напитков с использованием рутина и молочнокислых бактерий, отличающиеся увеличенным количеством БАВ, что влечет за собой разнообразие биотехнологической продукции и пробиотических препаратов нового поколения.

UDC 637.04:637.03

BIOTECHNOLOGY PRODUCTS ANGIOPROTECTIVE ACTION

Pavlovskaya N.E. Gorkova I.V., Gagarina I.N., Gavrilo A.Y., Gulyaeva K.N., Kostromicheva E.V.

Federal state budgetary educational institution of higher education "Orel state agrarian University named after N. V. Parakhina", Orel, Russia
302019, Orel, Generala Rodina, 69 D.
e-mail: i-gagarina@list.ru

The technology of obtaining functional additives containing substances of angioprotective action for the production of functional products and beverages has been developed. The technology provides for the use of domestic plant raw materials, selected to meet the quality requirements of the final products.

Key words: functional food, phenolic compounds, rutine

The need for the use of functional food products is dictated by the growing food deficit of minor components every year, which affects all segments of the population. It has been repeatedly proven that there is the closest relationship between food and human health, individual components can be the sole cause of many pathologies. New technological approaches to food production imply a purposeful impact on the body. The use of products containing biologically active substances with angioprotective, antioxidant, radioprotective, immunostimulatory

properties will contribute to the solution of the main issues of nutrition and elimination of disorders in the body associated with a lack of micronutrients.

To date, the vast majority of food ingredients are imported in Russia, so the organization of their production remains relevant. Enriched and functional products are composed of one or more components, which are contained in them in high quantities. These components are essential for the human body substances-vitamins, minerals and other biologically active substances, as well as individual macronutrients.

One of the sources of biologically active compounds of phenolic nature is buckwheat sowing *Fagopyrum esculentum* M. The various organs of buckwheat contain various antioxidant, angioprotective compounds, such as flavonoids and other phenols, which include rutin, quercetin, quercetrin, vitexin, hyperoside, isovitexin, orientin, proanthocyanidins, phenol – carboxylic and benzoic acids, vitamins B₁, B₂ and E. The content of rutin (absolutely dry weight) within the following limits: up to 55 mg/g (average – 18); in flowers from 5 to 50 mg/g (average – 20); in stems from 0.5 to 30 mg/g (average 2.5 – 3). The maximum percentage of the routine differed genotypes of buckwheat: Rumor, Anthocyanin, Ballad, Design, Demeter, Squad. It was found that the content of individual representatives of flavonoids is greater in generative organs than in vegetative ones. In fruits compared with flowers their content is reduced by 4-30 times. Rutin is localized mainly in flowers and leaves, quercetin, epicatechin, chlorogenic acid in flowers. And in the process of seed germination, the amount of routine and quercetin increases by 20-25 times by the seventh day, which is important due to the widespread use of buckwheat seedlings in the technology of functional food and beverages. Enrichment of products with natural angioprotectors improves physical and chemical properties.

The introduction of buckwheat bioflavonoids in the amount of 0.1% per 100 g of fat contained in the product into the formulation of meat products leads to a decrease in the acidic, 60% peroxide, 50% thiobarbitur number of lipids by 47%, and increases the shelf life by 2-3 times. Recipes and technologies of functional food and drinks with use of routine and lactic acid bacteria differing in the increased quantity of biologically active substances that involves a variety of biotechnological production and probiotic preparations of new generation are developed.

УДК 579.22:579.67

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ УМЕРЕННЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ КАК ПРОДУЦЕНТОВ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И ФЕРМЕНТОВ

Романова М.В., Галеева Ю.С., Шустов М.Д., Белодед А.В.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125047, Москва, Миусская площадь, д. 9
e-mail: romanovamariav@gmail.com

Методом накопительных культур из различных образцов компоста, активного ила и почвы выделены 45 штаммов умеренно термофильных бактерий. Для полученных культур была изучена способность образовывать органические кислоты, в том числе молочную кислоту, определена протеолитическая активность и другие, потенциально перспективные в биотехнологии, свойства.

Ключевые слова: термофильные бактерии, молочная кислота, протеолитические ферменты

Исследование ферментов, метаболических путей и кинетики роста термофильных бактерий показывает, что термофилы обладают рядом преимуществ по сравнению с мезофильными культурами микроорганизмов. Например, проведение процессов при повышенных температурах снижает риск контаминации, увеличивает растворимость субстратов, ускоряет диффузию веществ и облегчает выделение продуктов метаболизма [1]. Ферменты термофильных микроорганизмов – амилазы, целлюлазы, ксиланазы, протеазы и многие другие, как правило, обладают устойчивостью не только к повышенным температурам, но и к экстремальным значениям pH, действию комплексообразователей и окислителей, и поэтому находят все более широкое применение [2]. Целями данной работы являлись выделение и характеристика штаммов термофильных бактерий, а также оценка способности штаммов к синтезу органических кислот и протеолитических ферментов.

Для получения накопительных культур термофильных бактерий образцы природного происхождения вносили в элективные питательные среды, культивировали при 50-55 °C в течение 24 часов с несколькими пересевами в жидкую среду и последующим высевом на агаризованную среду.

Методом ВЭЖХ была определена способность полученных штаммов термофильных бактерий синтезировать органические кислоты на средах с углеводным субстратом. Из 45 выделенных штаммов 23 были способны синтезировать молочную кислоту в значимых количествах с минимальной концентрацией уксусной и пропионовой кислот. Для отобранных 5 штаммов, характеризующихся высоким выходом молочной кислоты, отсутствием ингибирования высокими концентрациями субстрата, ростом на минимальных средах, были проведены ферментации с рН- и термостатированием, с подпитками по глюкозе при необходимости. Один из выбранных штаммов суммарно утилизировал 146 г/л глюкозы с образованием 140,8 г/л молочной кислоты с пиковой продуктивностью 4 г/л*ч⁻¹ при практически полном отсутствии побочных продуктов брожения. Данный штамм является перспективным термофильным продуцентом молочной кислоты.

В ходе скрининга штаммов на наличие секретируемых гидролаз было обнаружено, что протеолитической активностью в разной степени обладают 30 штаммов, амилалитической – 19. Дальнейшие исследования включали в себя определение активности протеолитических ферментов, содержащихся в культуральной жидкости исследуемых штаммов. Культивирование осуществляли в аэробных или микроаэрофильных условиях на средах с повышенным содержанием белков и пептидов в течение 48 часов. Четыре штамма, предварительно отнесенные к р. *Bacillus*, показали высокую протеолитическую активность культуральной жидкости при гидролизе казеина, причем при культивировании в аэробных условиях наблюдалось снижение протеолитической активности данных штаммов.

Литература:

1. Zeldes B. M., Keller M. W., Loder A. J. et al. *Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals* // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6, P. 1-17.
2. Niehaus F., Bertoldo C., Kähler et al. *Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999. Vol. 51, P. 711-729.

UDC 579.22:579.67

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MODERATELY THERMOPHILIC BACTERIA AS PRODUCERS OF PRIMARY METABOLITES AND ENZYMES

Romanova M.V., Galeeva J.S., Shustov M.D., Beloded A.V.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
125047, Moscow, Miusskaya square, 9
e-mail: romanovamariav@gmail.com

45 strains of moderately thermophilic bacteria were isolated from various samples of compost, activated sludge and soil by method of enrichment culture. For obtained cultures we studied the ability to produce organic acids, including lactic acid, and determined proteolytic activity and other properties that are potentially promising in biotechnology.

Key words: thermophilic bacteria, lactic acid, proteolytic enzymes

The study of enzymes, metabolic pathway and growth kinetics of thermophilic bacteria shows that thermophiles have several advantages as compared to mesophilic cultures. For example, carrying out processes at elevated temperatures reduces risk of contamination, improves solubility of substrates, increases diffusion of compounds and facilitates recovery of products of metabolism. [1] Enzymes of thermophilic microorganisms, such as amylases, cellulases, xylanases, proteases and many others, as a rule, are resistant not only to elevated temperature, but also to extreme pH values, action of complexing and oxidizing, so they are used increasingly. [2] The aim of this work was isolation and characteristics of thermophilic bacterial strains, and determination of the ability of strains to produce organic acids and proteolytic enzymes.

To obtain enrichment cultures of thermophilic bacteria, environmental samples were introduced into selective nutrient medium and cultivated at 50-55 °C for 24 hours with serial passage in a liquid medium and streaking on agar medium.

The ability of obtained thermophilic bacterial strains to synthesize organic acids on medium with a carbohydrate source was determined by HPLC. 23 out of 45 isolated strains were able to produce lactic acid in significant quantities with minimum acetic and propionic acids formation. For selected 5 strains, characterized by high yield of lactic acid, lack of inhibition by high concentrations of substrate and growth on minimal medium, fermentations

with pH-stating and thermostating were carrying out with glucose feeds as necessary. One of selected strains utilized totally 146 g/L of glucose with formation 140,8 g/L of lactic acid with peak productivity of 4 g/L/hr almost without fermentation by-products. This strain is a promising thermophilic lactic acid producer.

During the screening of strains for presence of secreted hydrolases, it was found out that 30 out of 45 strains have proteolytic activity in a varying degree, and 19 out of 45 strains have amylolytic activity. Further studies included the determination of the activity of proteolytic enzymes which content in culture liquid of analyzed strains. The cultivation was carrying out under aerobic or microaerophilic conditions on medium with high content of proteins and peptides for 48 hours. 4 strains assigned previously to the genus *Bacillus* showed high proteolytic activity by hydrolysis of casein, and decrease of proteolytic activity was observed under aerobic cultivation.

References:

1. Zeldes B. M., Keller M. W., Loder A. J. et al. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6, P. 1-17.
2. Niehaus F., Bertoldo C., Kähler et al. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999. Vol. 51, P. 711-729.

УДК 664.8.022.6:634

ВЛИЯНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НА ВЫХОД СОКА ИЗ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ

Степакова Н.Н., Помозова В.А., Киселёва Т.Ф., Фролова Н.А., Шкрабтак Н.В.

Кемеровский государственный университет
Кемерово, Россия

650056, г. Кемерово, б-р Строителей, 47, корпус №7, ауд. 1310
e-mail: kisseleva.tf@mai.ru

Исследовано применение ферментных препаратов пектолитического и глюканолитического действия. Наилучшие результаты установлены при использовании пектолитических ферментов, причем увеличении дозы ферментных препаратов равномерно увеличивается выход сока.

Ключевые слова: ферментные препараты, плодово-ягодное сырье, сок

В настоящее время для обработки мякоти при производстве сокосодержащих напитков используют пектолитические ферменты, действие которых увеличивают выход соковой продукции, способствуют оптимизации экстрагирования природных красителей. Также для производства соковой продукции возможно использование амилолитических ферментов, которые способствуют расщеплению крахмала растительного сырья на сахара, и способствуют улучшению внешнего вида сока и увеличивая его стойкость при хранении [1].

Целью исследований явилось изучение применения таких ферментных препаратов как: Фруктоцим Колор, Pectinex XXL, Целлолюкс-А.

Мацерацию растительной ткани обеспечивают выбранные ферментные препараты (Фруктоцим Колор, Pectinex XXL) пектолитического действия за счет последовательно-параллельного действия всех компонентов комплекса Ферментные препараты (Целлолюкс-А) глюканолитического действия обладают способностью расщеплять целлюлозу и гемицеллюлозу и обладают комплексом элементов способных гидролизовать пектиновые вещества [2].

На первом этапе исследований размороженное с помощью СВЧ-печи ягодное сырье, измельчали и обрабатывали раствором ферментных препаратов различной концентрации. Дозировка ферментного препарата для исследования была выбрана в пределах от 0,01 – 0,04 % к массе перерабатываемого сырья. При этом была зафиксирована температура выдержки 50 °С. По выходу сока путем прессования после ферментной обработки определяли оптимальную дозировку. В качестве контрольного образца выступал образец сока без предварительной ферментной обработки.

Данные полученные в ходе экспериментальных исследований позволяют сделать вывод, что применение анализируемых ферментных препаратов для обработки ягодного растительного сырья при получении сока способствуют его увеличению. Наилучшие результаты установлены при использовании пектолитических ферментов, причем увеличении дозы ферментных препаратов равномерно увеличивается выход сока в среднем при обработке Фруктоцим Колор на 13 %, при обработке Pectinex XXL выход сока

увеличивается в среднем на 17,7 % по сравнению с контролем. Однако стоит отметить, что наиболее активный предел насыщения пектолитическими ферментами происходит при дозе 0,02 %, при дальнейшем увеличении дозы происходит незначительное снижение выхода сока.

Следовательно, на основании проведенного исследования был выбран ферментный препарат Pectinex XXL, оптимальной для обработки растительного сырья принимается доза 0,02 % при температуре 50 °C.

Литература:

1. Макарова Н. В. Новые тенденции в производстве сокосодержащих напитков // Пищевая технология. – 2008. – № 5. – С. 5 – 8.
2. Нуштаева Т.И. Пектиновые вещества плодово-ягодного и овощного сырья Кузбасса // Пищевая промышленность. – 1993. – № 8. – С. 12.

UDC 664.8.022.6:634

THE PROSPECTS OF BIOCATALYTIC PROCESSING OF BERRY RAW MATERIALS WITH FOR INCREASE IN AN EXIT OF JUICE

Stepakova N.N., Pomozova V.A., Kiseleva T.F., Frolova N.A., Shkrabtak N.V.

Kemerovo State University
Kemerovo, Russia
650056, Kemerovo, Boulevard Stroiteley, 47, building №7, aud. 1310
e-mail: kisseleva.tf@mai.ru

The use of enzyme preparations of pectolytic and glucanolytic action is investigated. The best results are established when using peletotic enzymes, and increasing the dose of enzyme preparations evenly increases the yield of juice.

Key words: enzyme preparations, fruit and berry raw materials, juice

At present, for the treatment of pulp in the production of juice-containing beverages, pectolytic enzymes are used, the effect of which increases the yield of juice products and helps to optimize the extraction of natural dyes. Also for the production of juice products, it is possible to use amyolytic enzymes, which contribute to the breakdown of vegetable raw materials starch into sugars, and help to improve the appearance of the juice and increase its stability during storage [1].

The purpose of the research was to study the use of such enzyme preparations as: Frutotsim Color, Pectinex XXL, Celllux-A.

Maceration of plant tissue is provided by selected enzyme preparations (Frutotsim Color, Pectinex XXL) of pectolytic action due to the series-parallel action of all components of the complex.

Enzyme preparations (Celllux-A) of glucanolytic action have the ability to break down cellulose and hemicellulose and have a complex of elements capable of hydrolyzing pectic substances [2].

At the first stage of the research, the raw berries, thawed with the help of a microwave oven, were crushed and treated with a solution of enzyme preparations of various concentrations. The dosage of the enzyme preparation for the study was chosen in the range from 0.01 to 0.04% by weight of the processed raw materials. At the same time, the holding temperature was 50 ° C. The yield of juice by pressing after enzymatic treatment determined the optimal dosage. The sample of the juice was used as a control sample without preliminary enzymatic treatment.

The data obtained in the course of experimental studies allow us to conclude that the use of analyzed enzyme preparations for the treatment of berry vegetable raw materials in the production of juice contribute to its increase. The best results were established when using peletotic enzymes, and increasing the dose of enzyme preparations evenly increases the juice yield on average when processing Fructocyme Collor by 13%, while processing Pectinex XXL juice output increases on average by 17.7% compared to the control. However, it should be noted that the most active limit of saturation with pectic enzymes occurs at a dose of 0.02%, with a further increase in dose, there is a slight decrease in the yield of juice.

Consequently, on the basis of the conducted research, the Pectinex XXL enzyme preparation was chosen, the optimal dose for processing vegetable raw materials is a dose of 0.02% at a temperature of 50 ° C.

References:

1. Makarova N. V. New trends in the production of juice-containing drinks // Food technology. - 2008. - № 5. - p. 5 - 8.
2. Nushtaeva T.I. Pectic substances of fruit and berry and vegetable raw materials of Kuzbass // Food industry. - 1993. - № 8. - p. 12.

УДК 573.6.086.83

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ БИОМАССЫ НИЗШИХ ГРИБОВ НА ВИТАМИННУЮ АКТИВНОСТЬ ЖЕЛЕЙНЫХ МАРМЕЛАДОВ

Юшина Е.А., Чечелева О.В., Богуш В.И., Чувашова Ж.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия
125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом. 11
e-mail: mgupp@mgupp.ru

Использование препарата из биомассы микромицета *Pythium gracile* в рецептурах желейных мармеладов обеспечивает специфические органолептические свойства и витаминную активность, в том числе F-витаминную активность, готовой продукции.

Ключевые слова: витамин F, микромицет *Pythium gracile*, полиненасыщенные жирные кислоты, органолептические показатели качества, стабилизатор консистенции

Витамин F – так принято называть ряд незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), которые принимают участие в метаболизме людей и животных.

Эти кислоты не могут быть синтезированы в организме человека, поэтому важно получать их из внешних источников.

По данным НИИ питания РАМН, дефицит потребления витамина F наблюдается у около 80% населения России.

Поскольку этот витамин не имеет аналогов, ученым пришлось искать как можно больше растительных и животных источников комплекса ПНЖК.

Одним из источников ПНЖК являются низшие грибы.

Микромицеты – это грибы и грибообразные организмы микроскопических размеров.

Известно, что некоторые микромицеты, в частности, штаммы плесневых грибов рода *Mortierella* (виды: *Mortierella gemmifera*, *Mortierella alpina*, *Mortierella humilis*, *Mortierella spinosa*, *Mortierella sarnyensis* и др.) культивируются для производства полиненасыщенных высших жирных кислот и их производных.

Применение препаратов из биомассы микромицетов в технологии пищевых продуктов способствует расширению спектра профилактических свойств за счет обеспечения содержания веществ с различной витаминной активностью.

Сухую биомассу микромицета *Pythium gracile* экстрагируют неполярным экстрагентом, например, двуокисью углерода или гексаном, в надкритическом состоянии. На этой стадии отделяют первый экстракт, используемый в дальнейшем при получении препарата. Далее биомассу последовательно экстрагируют водой, щелочью, водой, кислотой, водой, щелочью и водой. Полученный после завершения всех перечисленных стадий экстрагирования твердый остаток объединяют с первым экстрактом.

Подготовка компонентов для желейного мармелада следующая: сахар, лимонную кислоту, лактат натрия и пектин просеивают и пропускают через магнитный уловитель. Листья брусники и черники, цветки гибискуса инспектируют. Плоды шиповника и земляники инспектируют и моют. Перед экстрагированием плоды шиповника и земляники, листья брусники и черники, цветки гибискуса желательно измельчить. Далее цветки гибискуса, листья брусники, плоды шиповника, плоды земляники и листья черники смешивают в соотношении по массе 6:4:5:1:4 и заливают водой. Для интенсификации процесса экстрагирования воду целесообразно нагреть, или осуществлять экстрагирование при кипении экстрагента. После завершения экстрагирования фазы разделяют и доводят экстракт концентрированием до заданного содержания сухих веществ 2%. Рецептурное количество пектина смешивают с пятикратным количеством сахара, засыпают смесь в экстракт смеси цветков гибискуса, листьев брусники, плодов шиповника, плодов земляники и листьев черники, перемешивают до полного растворения, а затем постепенно вводят оставшееся от рецептурного количество сахара. Полученный сироп должен иметь содержание сухих веществ 48-50%. Далее сироп варят до достижения сухих веществ 75-77%.

Затем осуществляют разделку при введении лимонной кислоты, лактата натрия, ароматизатора «Лесная ягода» и препарата из биомассы микромицета *Pythium gracile* в рецептурных количествах.

При достижении температуры сиропа 80-85°C его направляют на разливку, формуют, желательно обсыпают сахарным песком или сахарной пудрой, сушат и фасуют.

Продукт готовят при следующем расходе компонентов (мас.ч.):

сахар – 710,8
пектин – 15
экстракт смеси цветков гибискуса, листьев черники,
плодов шиповника, листьев брусники и плодов земляники – 780
лимонная кислота – 7,5
лактат натрия – 7
ароматизатор «Лесная ягода» – 1
препарат из биомассы микромицета *Pythium gracile* – 1.

Полученные готовые изделия имеют кисло-сладкий вкус с горьковатым оттенком, стойкую плотную консистенцию, специфический приятный ягодный аромат, выраженную С-, В- и РР-витаминную активность, а также F-витаминную активность, не характерную для известных жележных изделий.

Таким образом, можно получить целевой продукт с гармоничным сочетанием органолептических свойств отечественного и английского мармелада и широким спектром витаминной активности, обеспечивающим профилактические свойства целевого продукта.

Специфику английского мармелада составляет горьковатый оттенок во вкусе. Специфику отечественного мармелада составляет более плотная консистенция. Полученный мармелад имеет вкус английского, а консистенцию отечественного мармелада.

Литература:

1. Домарецкий В.А. Технология экстрактов, концентратов и напитков из растительного сырья. – Изд-во «Форум», 2007. - 448 с.
2. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens // *World J. of Mikrobiol. & Biotechnol.* 2002.-Vol. 18.-P.165-167
3. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г. и др. Исследование синтеза арахидоновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахидоновой кислоты// *Микробиология*. 1996. - Т.65, вып.1. - с. 31-36
4. Лурье И.С. Технология кондитерского производства. – М.: Агропромиздат, 1992. - 399с.

UDC 573.6.086.83

INFLUENCE OF YEAST'S BIOMASS PREPARATIONS ON ACTIVITY OF JUICE JELLY VITAMINS

Yushina E. A., Chechelova O. V., Bogush V. I., Chuvashova Z. A.

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia
125080, Moscow, Volokolamskoe highway, 11
e-mail: mgupp@mgupp.ru*

Using of *Pythium gracile* micromycete biomass preparation in recipes of juicy jellies can provide specific organoleptic qualities and activity of vitamins including prepared food's activity of F vitamin.

Key words: vitamin F, *Pythium gracile* micromycete, polyunsaturated fatty acids (PUFA), organoleptic qualities, stabilizer of consistence

Polyunsaturated fatty acids, which take part in people and animal's metabolism, are taken to call F vitamin. These acids can not be synthesized in human organism, so it is important to get them from external sources. According to Institute of Nutrition RAMS 80 % population of Russia has lack of vitamin F. Yeasts are the one of sources of PUFAs.

Micromycetes are microscopic fungus and similar to fungus organisms.

As we know, some of the micromycetes, stamms of mold *Mortierella* are cultivating for production PUFAs and their derived substances in particular (kinds: *Mortierella gemmifera*, *Mortierella alpina*, *Mortierella humilis*, *Mortierella spinosa*, *Mortierella sarnyensis* etc.).

Using of micromycete biomass preparations in food production industry contributes to expansion of variety of prophylactic properties by providing substances with different activity of vitamins.

Dry *Pythium gracile* micromycete biomass extract by non-polar extractant, for example by CO₂ or hexane in supercritical state. In this stage separate the first extract, that are used further in producing of preparation. After that biomass consistently extracted by water, alkali, water, acid, water, alkali and water in the end. After all received

hard substance make dry and combine with the first extract.

Preparations of components for juicy jelly are: sugar, lemon acid, sodium lactate and pectin sift and skip through the magnetic catcher. Lingonberry and blueberry leaves, hibiscus flowers should be inspected. Rosehips and strawberries should be cleaned up and inspected. Rosehips, strawberries, lingonberry and blueberry leaves, hibiscus flowers should be preferably grounded. Then hibiscus flowers, lingonberry leaves, rosehips, strawberries and blueberry leaves should be mixed in 6:4:5:1:4 proportions and then water should be added. Water should be warmed to make the process of mixing more intense, or make extraction during the extractant is boiling. When the extraction is finished, phases should be separated and the dry matter content should become 2% after concentration. Pectin should be mixed with sugar in 1:5 proportions and then add to hibiscus flowers, lingonberry leaves, rosehips, strawberries and blueberry leaves, stirring until complete dissolution, after all add remaining sugar. 48-50% dry matter content syrup should be in the end. Syrup should be boiled until 75-77% dry matter content.

Then lemon acid, sodium lactate, "Wild berry" flavoring, *Pythium gracile* micromycete biomass preparation should be included according to recipe.

When temperature of syrup achieves 80-85°C degrees, it should be aimed to casting, formatting, dusting with sugar or powdered sugar preferably, drying and packaging.

The product is prepared with using of components in these proportions:

Sugar – 710, 8

Pectin – 15

Extract of mixed hibiscus flowers, lingonberry and blueberry leaves, rosehips, strawberries – 780

Lemon acid – 7,5

Sodium lactate – 7

"Wild berries" flavoring – 1

Pythium gracile micromycete biomass preparation – 1

Prepared products have sweet and sour taste with a bit bitter taste, stable and hard texture, specific and pleasant berry smell, highly expressed activity of vitamins C, B, PP, and activity of vitamin F, which is not usual for jelly products.

Therefore we can receive a new target product with Russian and English jelly's organoleptic qualities with a wide range of vitamins, which can provide prophylactic properties of target product.

A bitter taste makes a specificity of traditional English fruit jelly. Hard texture is a specificity of Russian juice jelly. Obtained product has a taste of English juice jelly, but texture of Russian.

References:

1. Domaretsky V.A. *Technology of extracts, concentrates and drinks from plant materials*. - Publishing House "Forum", 2007. - 448 p.
2. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens // *World J. of Mikrobiol. & Biotechnol.* 2002. - Vol. 18. - P. 165-167
3. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. and etc. Study of the synthesis of arachidonic acid by the fungus of the genus *Mortierella*: a microbiological method of selection of arachidonic acid producers // *Microbiology*. 1996. - T. 65, issue 1. - p. 31-36
4. Lurie I.S. *Confectionery technology*. - M.: Agropromizdat, 1992. - 399s.

УДК 637.344.8

ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ НА СТАБИЛЬНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ В УЛЬТРАФИТРАЦИОННЫХ КОНЦЕНТРАТАХ

Мельникова Е.И., Богданова Е.В.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий,
Воронеж, Россия
394036 Воронеж, пр. Революции, д. 19
e-mail: ek-v-b@yandex.ru

Рассмотрено влияние технологических режимов тепловой обработки подсырной сыворотки на функциональные свойства УФ-концентратов сывороточных белков.

Ключевые слова: подсырная сыворотка, УФ-концентраты, технологические режимы обработки, функциональные свойства белков

В условиях ресурсосбережения перспективным направлением переработки подсырной сыворотки является фракционирование ее белково-углеводо-минерального комплекса, что позволяет получить пищевые ингредиенты с высокой надбавленной стоимостью. Наиболее востребованными из них являются сывороточные белковые концентраты. Это обусловлено их способностью проявлять важные физико-химические свойства и выполнять ряд технологических функций в пищевых системах. Направления использования концентратов сывороточных белков определяются массовой долей белка в них (не менее 35 и 55 %) [1].

С целью получения УФ-концентратов сывороточных белков с различным фактором концентрирования проводили ультрафильтрацию подсырной сыворотки при $t = (10 - 12) ^\circ\text{C}$. Выбор режима обоснован необходимостью минимального воздействия на нативную структуру белков, предотвращения размножения микроорганизмов в ретентате и осаждения фосфата кальция в порах мембранных модулей.

Известно, что функциональные свойства белков обусловлены способностью к гидратации, поверхностной активностью и типом межбелковых взаимодействий в частично развернутых структурах [2].

Поверхностная активность определяет жироудерживающую и эмульгирующую способности и является функцией гидрофобности поверхности молекулы белка и ее трансформируемости, позволяющей молекуле разворачиваться и распределяться по поверхности раздела фаз. Поскольку УФ-концентрат сывороточных белков представляет собой смесь β -лактоглобулина и α -лактоальбумина, а также других минорных белков, при эмульгировании эти компоненты белковой смеси конкурируют друг с другом за адсорбцию на границе раздела фаз. Состав белковой пленки на этой границе будет определяться относительной поверхностной активностью отдельных белков в смеси.

Минимальной поверхностной активностью среди белков молочной сыворотки характеризуется β -лактоглобулин [2]. Однако, частичная денатурация белков в УФ-концентрате посредством пастеризации при $t = (76 \pm 2) ^\circ\text{C}$, не приводящая к полной потере растворимости сывороточных белков, способствует улучшению эмульгирующих свойств. Это обусловлено тем, что молекулы β -лактоглобулина, содержащие свободные сульфгидрильные группы и дисульфидные мостики, подвергаются медленной полимеризации посредством дисульфид-сульфгидрильных реакций, что приводит к образованию вязкоэластичной пленки на границе раздела фаз «масло – вода».

Межмолекулярные взаимодействия между частично развернутыми белковыми структурами определяют влагоудерживающую способность и являются функцией стабильности и структуры белка. Поскольку необратимые структурные изменения в молекуле β -лактоглобулина происходят при кратковременном нагревании до температуры выше $80 ^\circ\text{C}$, а термическая денатурация α -лактоальбумина при температуре до $95 ^\circ\text{C}$ обратима [3], необходимо применять щадящие режимы тепловой обработки УФ-концентратов сывороточных белков при последующем сгущении и сушке для обеспечения их максимальной структурной стабильности.

Литература:

1. ГОСТ Р 53456-2009. Концентраты сывороточных белков сухие. Технические условия.
2. Феннема, О. Р. Химия пищевых продуктов / О. Р. Феннема, Ш. Дамодаран, К. Л. Паркин. – Перев. с англ. – СПб.: Профессия, 2017. – 1040 с.
3. Тёпел, А. Химия и физика молока / А. Тёпел. – СПб.: Профессия, 2012. – 832 с.

UDC 637.344.8

INFLUENCE OF HEAT TREATMENT ON STABILITY OF WHEY PROTEINS IN ULTRAFILTRATION CONCENTRATES

Melnikova E.I., Bogdanova E.V.

FSBEI HE Voronezh State University of Engineering Technologies,
Voronezh, Russia
394036, Russia, Voronezh, Revolution Av., 19
e-mail: ek-v-b@yandex.ru

The influence of processing modes of heat treatment of cheese whey on the functional properties of UF-concentrates of whey proteins has been considered.

Key words: cheese whey, UF-concentrates, processing modes, functional properties of proteins

In conditions of resource-saving fractionation of a protein-carbohydrate-mineral complex of cheese whey

is a perspective approach to its processing, which allows to obtain food ingredients with high added value. The most popular of them are whey protein concentrates. This is due to their ability to exercise important physical and chemical properties and to fulfil a several technological functions in food systems. Application of whey protein concentrates are determined by protein content in them (not less than 35 and 55 %) [1].

Ultrafiltration of cheese whey was carried out at $t = (10-12) ^\circ\text{C}$ in order to obtain UF-concentrates of whey proteins with different concentration factor. The choice of the method is justified by the necessity to minimize impact on the native structure of proteins, to prevent microbial reproduction in the retentate and precipitation of calcium phosphate in the pores of membrane modules.

It is known that the functional properties of proteins are determined by the ability to hydration, surface activity and the type of protein-protein interactions in partially unfolded structures [2].

Surface activity determines the fat-holding and emulsifying ability. It is a function of the surface hydrophobicity of the protein molecule and its flexibility, allowing the molecule to uncoil and to spread over the phase boundary. Since the UF-concentrate of whey proteins is a mixture of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin, as well as other minor proteins, these components of the protein mixture compete with each other for adsorption on the border of the face in the process of emulsifying. The composition of the protein film on this border face will be determined by the relative surface activity of individual proteins in the mixture.

β -lactoglobulin is characterized by minimal surface activity among whey proteins [2]. However, partial denaturation of proteins in UF-concentrate by pasteurization at $t = (76 \pm 2) ^\circ\text{C}$, which does not lead to a complete loss of the solubility of whey proteins, improves emulsifying properties. This is because β -lactoglobulin molecules containing free sulphhydryl groups and disulfide bridges undergo slow polymerization due to disulfide-sulphhydryl reactions, which leads to the formation of a viscoelastic film on the border of fat-water faces.

Intermolecular interactions between partially unfolded protein structures determine the water-holding ability. They are a function of the stability and structure of the protein. Since irreversible structural changes in the β -lactoglobulin molecule occur at short-term heating to a temperature above $80 ^\circ\text{C}$, and thermal denaturation of α -lactoalbumin at a temperature up to $95 ^\circ\text{C}$ is reversible [3], it is necessary to apply partial execution modes of heat treatment of UF-concentrates of whey proteins during the subsequent evaporation and drying to ensure maximum structural stability.

References:

1. GOST R 53456-2009. *Whey protein concentrate powders. Specifications.*
2. Fennema, O. R. *Food chemistry* / O. R. Fennema, Sh. Damodaran, K. L. Parkin. – SPb. : Professiya, 2017. – 1040 p.
3. Tyopel, A. *Chemistry and physics of milk* / A. Tyopel. – SPb. : Professiya, 2012. – 832 p.

УДК 663.12:579.67

ВЛИЯНИЕ ФИТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОКОНВЕРСИИ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ

Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Антонова А.А., Ожмегова Е.Н., Серб Е.М.

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. 4-Б
e-mail: serbae@mail.ru

Исследовано влияние ферментов фитолитического действия на степень конверсии зернового сырья, содержание фосфора в среде, на процессы генерации дрожжей и спиртового брожения, на состав летучих веществ в дистиллятах.

Ключевые слова: спиртовые дрожжи, фитолитические ферменты, фосфор, этанол, брожение, зерновое сусло, метаболиты

Основой современных технологий спирта являются биокаталитические процессы глубокой переработки зернового сырья, в которых участвуют амилазы, протеазы и гемицеллюлазы [1-2]. Синергизм их действия способствует улучшению качественных характеристик зернового сусла и его реологических свойств. В то же время известно, что в зернах злаковых культур присутствует фитиновая кислота, соли которой (фитаты) являются основной формой содержания минерального фосфора в растениях [3, 4]. Биодоступность связанного фосфора можно повысить за счет гидролиза зерна ферментными препаратами,

содержащими фитазу. Однако актуальные данные о влиянии фитолитических ферментов на качество зернового суслу, процессы генерации дрожжей и спиртового брожения практически отсутствуют.

Цель работы - исследование влияния фитолитического действия на минеральный состав зернового суслу, содержание фосфора в среде, рост дрожжей, образование этанола и качество дистиллятов.

Установлено, что в результате использования фитаз концентрация фосфора в зерновом сусле увеличивалась, особенно в кукурузном, в котором доля фосфатов повысилась в 2,7 раза. Обогащение питательных сред фосфатами в результате действия фитазы обеспечивало стабильный процесс спиртового брожения. Анализ динамики процесса показал, что наличие фосфора в среде способствовало интенсификации развития дрожжей, особенно в первые 18 ч роста, концентрация дрожжевых клеток увеличивалась в 1,3 раза.

Использование в составе ферментативного комплекса фитазы обеспечивало снижение образования побочных метаболитов, сопутствующих синтезу этанола. Концентрация летучих веществ в дистиллятах к концу брожения снижалась в 1,3-1,4 раза за счет снижения синтеза высших и ароматических спиртов, что позволяет улучшить качество конечного продукта - этанола.

Установлена тенденция повышения скорости сбраживания углеводов и синтеза этанола. Выход спирта увеличивался на 1,1-3,2 % в зависимости от вида сбраживаемого сырья.

Таким образом, подтверждено, что синергизм действия ферментов различной субстратной специфичности на полимеры зернового сырья позволяет повысить эффективность их конверсии при сбраживании зернового суслу. Показано, что использование ферментов фитолитического действия при гидролизе полимеров зернового суслу обеспечивает улучшение фосфорного питания дрожжей, способствует интенсификации процессов их генерации и брожения, повышению уровня синтеза этанола спиртовыми дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* с одновременным снижением образования побочных метаболитов.

Исследования проведены в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 г.г. (тема № 0529-2019-0066).

Литература:

1. Туршатов М.В., Леденев В.П., Кононенко В.В., Кривченко В.А., Соловьев А.О., Моисеева Н.Д. Техно-экономические аспекты получения спирта из вторичных сырьевых ресурсов, образуемых при комплексной переработке пшеницы // Производство спирта и ликероводочных изделий. - 2015. - № 1. - С. 33-35.
2. Абрамова И.М. Особенности переработки пшеничного сырья, обеспечивающие производство спирта с высокими показателями качества // Производство спирта и ликероводочных изделий. - 2012. - № 1. - С. 4-6.
3. Benesova K., Belakova S., Mikulikova R., Svoboda Z. Survey Of The Analytical Methods For The Phytic Acid Determination // Kvasny Prumysl. - 2013. - Vol. 59. - N 4. - P. 127-133.
4. Mikulski D., Klosowski G. Phytic Acid Concentration In Selected Raw Materials And Analysis Of Its Hydrolysis Rate With The Use Of Microbial Phytases During The Mashing Process // Journal Of The Institute Of Brewing. - 2015. - Vol. 121. - N 2. - P. 213-218.

UDC 663.12:579.67

EFFECT OF PHYTOLYTIC ENZYMES ON THE EFFICIENCY OF BIOCONVERSION OF GRAIN RAW MATERIALS

Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Antonova A.A., Ozhmegova E.N., Serba E.M.

All-Russian 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

Influence of enzymes of phytolytic action on extent of conversion of grain raw materials, phosphorus content in the environment, on processes of generation of yeast and spirit fermentation, on composition of volatiles in distillates is investigated.

Key words: alcoholic yeast, phytolytic enzymes, phosphorus, ethanol, fermentation, grain mash, metabolites

The basis of modern alcohol technologies are biocatalytic processes of the deep processing of grain raw materials, in which amylases, proteases and hemicellulases are involved [1-2]. The synergism of their action helps to improve the quality characteristics of the grain wort and its rheological properties. At the same time, it is known that phytic acid is present in the grains of cereals, whose salts (phytates) are the main form of the content of

mineral phosphorus in plants [3, 4]. The bioavailability of bound phosphorus can be enhanced by hydrolysis of grain with enzyme preparations containing phytase. However, actual data on the effect of phytolytic enzymes on the quality of grain wort, the processes of yeast generation and the alcohol fermentation are practically absent.

Objective: investigate the effect of phytolytic action on the mineral composition of grain wort, the phosphorus content in the medium, the growth of yeast, the formation of ethanol and the quality of distillates.

It was found that as a result of the use of phytases, the concentration of phosphorus in grain wort increased, especially in corn wort, in which the proportion of phosphates increased 2.7 times. Enrichment of nutrient media with phosphates as a result of the action of phytase ensured a stable process of alcohol fermentation. Analysis of the dynamics of the process showed that the presence of phosphorus in the medium contributed to the intensification of yeast generation, especially in the first 18 hours of growth, the concentration of yeast cells increased 1.3 times.

The use of phytase in the enzymatic complex provided a decrease in the formation of side metabolites accompanying ethanol synthesis. By the end of fermentation, the concentration of volatile substances in distillates decreased 1.3-1.4 times due to a decrease in the synthesis of higher and aromatic alcohols, which makes it possible to improve the quality of the final product, ethanol.

The tendency to increase the speed of fermentation of carbohydrates and ethanol synthesis has been established. The alcohol yield increased by 1.1-3.2%, depending on the type of fermented raw materials.

Thus, it is confirmed that the synergism of the action of enzymes of different substrate specificity on the polymers of grain raw materials allows to increase the efficiency of their conversion during the fermentation of grain wort. It has been shown that the use of phytolytic enzymes in the hydrolysis of grain wort polymers provides an improvement in the phosphorus nutrition of yeast, contributes to the intensification of the processes of their generation and fermentation, and increases the level of ethanol synthesis by alcoholic yeast *Saccharomyces cerevisiae* while reducing the formation of side metabolites.

The studies were carried out within the framework of the Program of Basic Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2013-2020 (topic number 0529-2019-0066).

References:

1. Turshatov M. V., Ledenev V. P., Kononenko V. V., Krivchenko V. A., Soloviev A. O., Moiseeva N. D. Technical and economic aspects of obtaining alcohol from secondary raw materials formed during complex processing of wheat // *Production of alcohol and alcoholic beverages*. - 2015. - № 1. - P. 33-35.
2. Abramova I. M. Features of processing of wheat raw materials, ensuring the production of alcohol with high quality // *Production of alcohol and alcoholic beverages*. - 2012. - № 1. - P. 4-6.
3. Benesova K., Belakova S., Mikulikova R., Svoboda Z. Survey Of The Analytical Methods For The Phytic Acid Determination // *Kvasny Prumysl.* - 2013. - Vol. 59. - N 4. - P. 127-133.
4. Mikulski D., Klosowski G. Phytic Acid Concentration In Selected Raw Materials And Analysis Of Its Hydrolysis Rate With The Use Of Microbial Phytases During The Mashing Process // *Journal Of The Institute Of Brewing*. - 2015. - Vol. 121. - N 2. - P. 213-218.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77

ВЛИЯНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА ГВОЗДИКИ НА ПЕНООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ЛИПИДАМИ

Гуреева М.Д.¹, Чеботарёв С.А.¹, Самусева Ю.В.¹, Зеликина Д.В.², Makasa Akwebiwa J.², Антипова А.С.², Мартиросова Е.И.², Мишарина Т.А.², Семёнова М.Г.².

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия. 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9

²Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия. 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4.
e-mail: masgureeva@yandex.ru

Изучено влияние эфирного масла гвоздики на пенообразующие свойства комплексов изолята сывороточных белков молока с комбинацией биологически активных липидов (липосом фосфатидилхолина, наполненных как незаменимой омега-3 альфа-линоленовой жирной кислотой, так и триглицеридами рыбьего жира, содержащими > 60% длинноцепочечных омега-3 жирных кислот).

Ключевые слова: эфирное масло гвоздики, пенообразующие свойства, изолят сывороточных белков молока, биологически активные липиды, супрамолекулярные комплексы, структура

С целью разработки инновационных физиологически-функциональных ингредиентов для функциональных продуктов питания коллоидного типа [1] исследовано влияние наиболее перспективного растительного антиоксиданта, а именно эфирного масла гвоздики (ЭМГ) [2], на пенообразующие способности супрамолекулярных комплексов, сформированных между изолятом сывороточных белков молока и комбинацией эссенциальных биологически активных липидов (липосом фосфатидилхолина (ФХ), наполненных как незаменимой (омега-3) альфа-линоленовой жирной кислотой (АЛК), так и триглицеридами рыбьего жира (РЖ)). Выбор ЭМГ для данного исследования был основан на данных газо-жидкостной хроматографии, свидетельствующих о наибольшей антиоксидантной активности ЭМГ в защите полиненасыщенной омега-3 АЛК от автоокисления по сравнению с другими эфирными маслами (листьев корицы, орегано, имбиря и др.). Влияние ЭМГ на пенообразующие свойства супрамолекулярных комплексов изучали, измеряя: (1) дисперсность пен (при помощи цифровой фотокамеры); (2) скорость перехода в пену одинакового объема раствора образца; (3) высоту пены; (4) скорость дренажа водной среды из пены; (5) время полураспада пены. Было установлено, что ЭМГ, влияя в основном на степень ассоциации белка в его супрамолекулярных комплексах с липидами, существенно изменяет пенообразующую способность этих комплексов. Наиболее ярко это влияние проявляется в случае комплексов белка с липосомами ФХ, наполненными триглицеридами РЖ. Для объяснения найденной пенообразующей способности комплексов использовали информацию об их структурных и термодинамических параметрах, полученную методом лазерного светорассеяния в статическом, динамическом и электрофоретическом режимах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

Литература:

1. Semenova M.G., Dickinson E. *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions*. Brill Publishers (The Netherlands), 2010. 350 p.
2. Misharina T. A., Alinkina E. S., Vorobjeva A. K., Terenina M. B., Krikunova N. I. Inhibition of oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters by essential oils// *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. Vol 52. № 3. P. 336–341.

UDK 544.3.03: 544.032: 544.77

EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL OF CLOVE BUD ON THE FOAMING ABILITIES OF THE COMPLEXES OF THE WHEY PROTEINS ISOLATE WITH BIOLOGICALLY ACTIVE LIPIDS

Gureeva M.D.¹, Chebotarev S.A.¹, Samuseva Y.V.¹, Zelikina D.V.², Makasa Akwebiwa J.¹, Antipova A.S.², Martirosova E.I.², Misharina T.A.², Semenova M.G.²

¹ D. I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia. 125047 Moscow, Miusskaya sq., 9

² N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. 119334 Moscow, Kosygin str., 4.
e-mail: masgureeva@yandex.ru

The effect of the essential oil of clove bud has been studied on the foaming abilities of the complexes of the whey protein isolate with a combination of biologically active lipids (liposomes of phosphatidylcholine loaded with both the essential alpha linolenic acid and triacylglycerols of fish oil, containing > 60% of the long-chain omega-3 fatty acids).

Key words: essential oil of clove bud, foaming abilities, whey protein isolate, biologically active lipids, supramolecular complexes, and structure

In order to develop the innovative physiologically-functional ingredients for functional food of colloidal type [1], the effect of the most promising plant antioxidant, namely the essential oil of clove bud (EOC) [2], has been studied on the foaming abilities of the supramolecular complexes, which were formed between the whey protein isolate and a combination of biologically active lipids (liposomes of phosphatidylcholine (PC) loaded with both the essential alpha linolenic acid (ALA) and triacylglycerols of fish oil (FO)). The selection of the EOC for this study has been based on the data of gas-liquid chromatography that indicated its most antioxidant activity as compared with other plant antioxidants (cinnamon leaves, oregano, ginger, etc.) in the protection of omega-3 ALA against oxidation. The effect of the EOC on the foaming capacity of the supramolecular complexes were studied by measuring the

following: (1) the foam dispersity (using a digital photo camera); (2) the velocity of foaming of the same volume of the sample solutions; (3) the foam height; (4) the velocity of the drainage of aqueous medium from the foams and (5) the foam half-life time. EOC changed significantly the foaming capacity of the supramolecular complexes of the protein with lipids due to the EOC impact on the protein association in the complexes. This effect was more pronounced for the supramolecular complexes of the protein with the PC liposomes loaded with FO. To explain the found foaming abilities of the complexes we have used the information on their structural and thermodynamic parameters measured by laser light scattering in its static, dynamic and electrophoretic modes. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 18-316-00111.

References:

1. Semenova M.G., Dickinson E. *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions*. Brill Publishers (The Netherlands), 2010. 350 p.
2. Misharina T. A., Alinkina E. S., Vorobjeva A. K., Terenina M. B., Krikunova N. I. Inhibition of oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters by essential oils// *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. Vol 52. № 3. P. 336–341.

УДК 637.1

ВЫБОР ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНОГО НАПИТКА С МИКРОПАРТИКУЛЯТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Мельникова Е.И., Станиславская Е.Б.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия
 394010 г. Воронеж, пр. Революции, д. 19
 e-mail: tereshkova-katia@yandex.ru

Подобраны закваски смешанных культур *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, позволяющие получить густую, однородную консистенцию кисломолочных напитков с микропартикулятом и не удлиняющие процесс кислотообразования.

Ключевые слова: микропартикулят, кисломолочный напиток, заквасочные культуры

Производство микропартикулятов сывороточных белков с целью применения в технологии пищевых продуктов относится к одному из инновационных направлений реализации биотехнологического потенциала молочной сыворотки. Схема получения микропартикулятов предусматривает термомеханическую обработку белковых концентратов, полученных с помощью мембранных методов обработки сыворотки [1]. Микропартикуляты характеризуются органолептическими свойствами, имитирующими флейвор молочного жира, поэтому улучшают консистенцию низкожирных продуктов [2].

Предложено использование микропартикулята творожной сыворотки в технологии кисломолочных напитков для частичной замены молочного сырья. Внесение микропартикулята оказывает влияние на свойства нормализованной смеси: соотношение доли белков и лактозы, титруемую кислотность. Для продуктов с измененным компонентным составом большое внимание уделяется подбору заквасочных культур [3]. Для этого при получении кисломолочного напитка с микропартикулятом исследовали возможность применения различных заквасок смешанных культур *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* производства компании Христиан Хансен. Наилучшей кислотообразующей способностью в нормализованных смесях с добавлением микропартикулята характеризовались закваски YF L 901 и YF L 706, позволяющие получить плотный сгусток за 5 - 6 ч.

Одним из компонентов разработанного кисломолочного напитка является сахароза. Использование ее увеличивает синтез заквасочными культурами экзополисахаридов, увеличивая вязкость и однородность продукта [4]. В присутствии микропартикулята, как компонента с пребиотическими свойствами, обусловленными высоким содержанием лактозы, белка и свободных аминокислот, выработка экзополисахаридов усиливается. Качество готового продукта улучшается: повышается плотность, вязкость сгустка, замедляется синерезис. Большое значение это имеет при выработке кисломолочных напитков с пониженной жирностью, позволяет исключить или значительно снизить массовую долю стабилизаторов и загустителей. Применение закваски YF L 706 не удлиняло процесс сквашивания нормализованной смеси и способствовало получению вязкой, сливочной консистенции кисломолочного напитка (Рисунок 1).

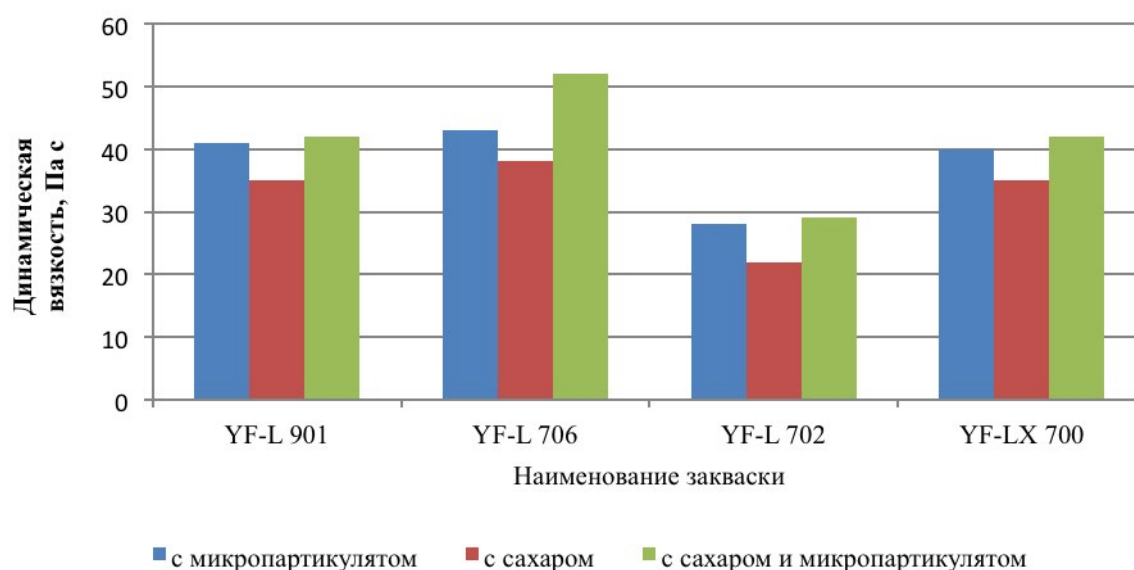


Рис. 1. Влияние микропартикулята сывороточных белков и сахарозы на вязкость готового продукта.

Выполненные исследования послужили основой для разработки рецептуры и совершенствования технологии сладкого кисломолочного напитка с микропартикулятом сывороточных белков. Предложенное технологическое решение предусматривает введение дополнительных операций по получению микропартикулята.

Литература:

1. Мельникова, Е. И., Станиславская, Е. Б., Подгорный, Н. А. Имитатор молочного жира для синбиотических продуктов // *Молочная промышленность*. – 2010. – № 7. – С. 55 – 56.
2. Мельникова, Е. И., Станиславская Е.Б. Микропартикуляты сывороточных белков как имитаторы молочного жира в производстве продуктов питания // *Фундаментальные исследования*. – 2009. – № 7. – С. 23.
3. Тихомирова, Н. А. Функционально необходимые компоненты и технологические вспомогательные средства // *Молочная промышленность*. – 2016. – № 6. – С. 42-44.
4. Ботина С. Г. и др. Технологические свойства штаммов *Streptococcus thermophilus*, выделенных из кисломолочных продуктов // *Биотехнология*. – 2007. – № 2. – С. 21 – 27.
5. Хамагаева И. С., Тумунова С. Б., Замбалова Н. А. Внеклеточные метаболиты, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами // *Молочная промышленность*. – 2010. – № 7. – С. 27 – 28.

UDC 637.1

SELECTION OF FERROUS CULTURES FOR THE PRODUCTION OF ACID-FOLK DRINK WITH MICROPARTICULATOR OF SERUM PROTEINS

Melnikova E.I., Stanislavskaja E.B.

Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia
394010 Voronezh, Revolution Avenue, 19
e-mail: tereshkova-katia@yandex.ru

The starter cultures of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* were selected, which make it possible to obtain a dense, uniform consistency of fermented milk drinks with a microparticle and not extending the acid formation process.

Key words: microparticulate, fermented milk drink, starter cultures

Production of microparticulates of whey proteins for the purpose of application in food technology is one of the innovative areas of the implementation of the biotechnological potential of whey. The scheme for producing

microparticulates provides for thermomechanical processing of protein concentrates obtained using membrane serum processing methods [1]. Microparticulates are characterized by organoleptic properties that mimic the flavor of milk fat, therefore, improve the consistency of low-fat products [2].

The use of microparticulate curd whey in the technology of fermented milk drinks for the partial replacement of raw milk has been proposed. The introduction of microparticulum affects the properties of the normalized mixture: the proportion of proteins and lactose, titrated acidity. For products with a modified component composition, great attention is paid to the selection of starter cultures [3]. To do this, when receiving a fermented milk drink with a microparticle, the possibility of using various starters of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, manufactured by Christian Hansen, was investigated. The best acid-forming ability in normalized mixtures with the addition of microparticulate was characterized by the starter cultures YF L 901 and YF L 706, which make it possible to obtain a dense clot in 5-6 hours.

One of the components of the developed fermented milk drink is sucrose. Its use increases the synthesis of exopolysaccharide starter cultures, increasing the viscosity and homogeneity of the product [4]. In the presence of microparticulum, as a component with prebiotic properties, due to the high content of lactose, protein and free amino acids, the production of exopolysaccharides is enhanced. The quality of the finished product improves: the density increases, the viscosity of the clot, slows down syneresis. This is of great importance in the production of fermented milk drinks with reduced fat content, which makes it possible to eliminate or significantly reduce the mass fraction of stabilizers and thickeners. The use of the ferment YF L 706 did not lengthen the process of ripening the normalized mixture and contributed to obtaining a viscous, creamy consistency of sour-milk drink (Figure 1).

The completed studies served as the basis for the formulation and improvement of the technology of sweet fermented milk drink with microparticulate whey proteins. The proposed technological solution provides for the introduction of additional operations for obtaining microparticulum.

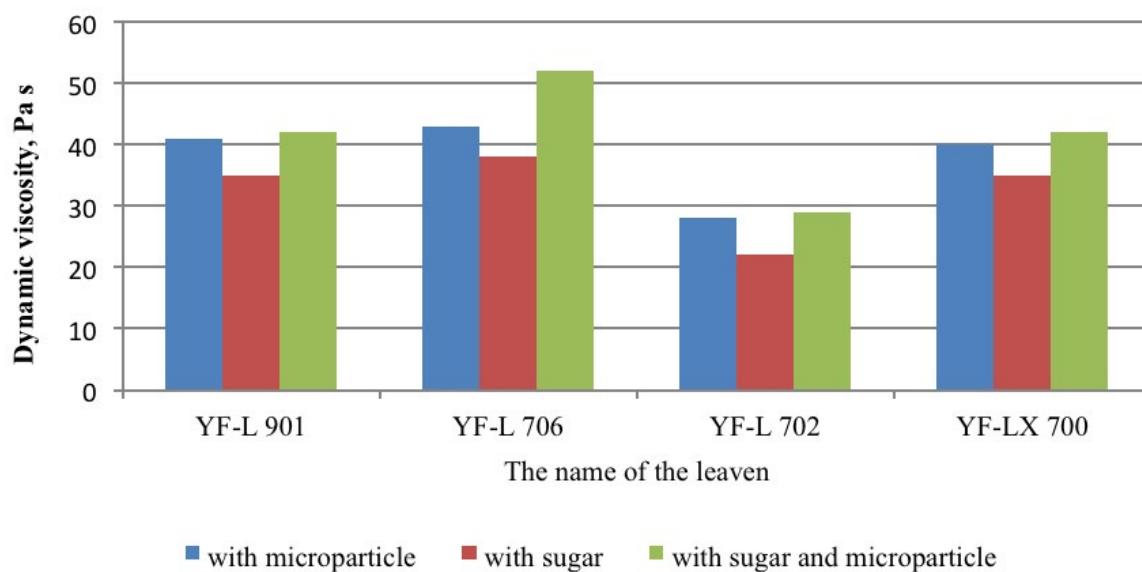


Fig.1. The effect of microparticulate whey proteins and sucrose on the viscosity of the finished product.

References:

1. Mel'nikova, E. I., Stanislavskaya, E. B., Podgorniy, N. A. Imitator molochnogo zhira dlya sinbioticheskikh produktov // *Molochnaya promyshlennost'*. – 2010. – № 7. – S. 55 – 56.
2. Mel'nikova, E. I., Stanislavskaya E.B. Mikropartikulyaty syvorotochnyh belkov kak imitatory molochnogo zhira v proizvodstve produktov pitaniya // *Fundamental'nye issledovaniya*. – 2009. – № 7. – S. 23.
3. Tihomirova, N. A. Funkcional'no neobhodimye komponenty i tekhnologicheskie vspomogatel'nye sredstva // *Molochnaya promyshlennost'*. – 2016. – № 6. – S. 42-44.
4. Botina S. G. i dr. Tekhnologicheskie svoystva shtammov *Streptococcus thermophilus*, vydelennykh iz kislomolochnykh produktov // *Biotehnologiya*. – 2007. – № 2. – S. 21 – 27.
5. Hamagaeva I. S., Tumunova S. B., Zambalova N. A. Vnekletochnye metabolity, sinteziruemye probioticheskimi mikroorganizmami // *Molochnaya promyshlennost'*. – 2010. – № 7. – S. 27 – 28.

УДК 664.38

ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПОЗИТЫ ИЗ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЗЕРНА ТРИТИКАЛЕ И ГОРОХОВОЙ МУКИ

Куликов Д.С., Гулакова В.А., Колпакова В.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопроductов – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Красково, Россия
140051, Московская обл., Люберецкий р-н, пос. Красково, ул. Некрасова, д. 11.
e-mail: denismalah@mail.ru; val-kolpakova@rambler.ru

С применением биотехнологических приемов разработаны белковые композиты пищевого назначения с улучшенным аминокислотным составом, по отношению к сырьевым источникам. Сырьем явились вторичный продукт переработки зерна тритикале на крахмал (экстракт, замочные воды) и цельносомлотая гороховая мука. Химические показатели и функционально-технологические свойства белковых композитов соответствовали показателям коммерческих образцов сухой пшеничной клейковины и белковым продуктам из других зерновых культур.

Ключевые слова: тритикалевый экстракт; гороховая мука; белковые композиты; ферментные препараты

Известно, что зерновые культуры и белковые препараты, получаемые на их основе, не сбалансированы по аминокислотному составу (АС). На основании разработанной нами компьютерной программы рассчитаны соотношения белковых компонентов из вторичных продуктов переработки зерна тритикале на крахмал (экстракт и крахмал Б) и гороховой муки для создания двухкомпонентных композитов с улучшенным АС. Для первых трех лимитирующих аминокислот зерна тритикале (лизина, треонина, метионина+цистина), с учетом их массовой доли в 100 г продукта, массовой доли белка в продукте (в %) и «эталонной» шкалы ФАО/ВОЗ (1973 г), рассчитаны значения аминокислотного сора и экспериментально подтверждено, что зерно тритикале бедно лизином, треонином, серосодержащими аминокислотами, а гороха – метионином+цистином. При балансировке белков тритикалевого экстракта (ТЭ) белками гороха при соотношении их по массовой доле, соответственно, 1:3÷1:5 скор серосодержащих аминокислот в композитах не превышал 70%. Однако скор треонина был близок к 100%, лизина - свыше 100%. Композиты выделяли по разработанной ранее схеме жидкостным биотехнологическим способом с использованием ферментных препаратов (ФП) [1], исключающих разрушение структуры и состава белковых фракций сырья, в отличие от кислот и щелочей [2]. ФП получены от фирмы «Novozymes»: Shearzym 500 L с ксиланазной активностью, Viscoferm L с цитолитической активностью, Fungamyl 800 L и AMG 300 L с активностью амилазы и глюкоамилазы, соответственно, протеолитический ФП Distizym Protacid - от фирмы «Erbislon». Показатели состава и функциональных свойств белковых композитов приведены в табл. 1. Препараты имели высокую массовую долю белка (75-80%), остальные показатели также соответствовали группе «Концентраты». Все показатели сходны с показателями сухой пшеничной клейковины. Значительных отличий в показателях, в зависимости от различного соотношения белков, не обнаружено.

Таблица 1. Химический состав белковых композитов.

Соотношение белка ТЭ и гороховой муки в составе БК	Влага, %	Массовая доля, % на СВ			
		Белок Nx6.25	Жир	Зола	Углеводы
1:3	2,90±0,04	80,40±1,03	1,97±0,04	3,53±0,06	14,10±1,0
1:5	4,80±0,03	75,44±0,09	4,94±0,20	2,93±0,3	16,73±0,7
	Функциональные свойства				
	Растворимость, %		ВСС, %	ЖСС, %	ЖЭС, %
1:3	0,39±0,05		230±2	131±0,5	45,0±1,0
1:5	0,13±0,03		263±1	131±0,0	45,0±0,0

Примечание: ВСС - водосвязывающая способность, ЖСС - жирсвязывающая способность, ЖЭС - жиромульгирующая способность

В итоге, осуществлен биокаталитический процесс получения пищевых белковых композитов из ТЭ и гороховой муки с комплементарным аминокислотным составом с применением гидролитических ФП (целлюлаз, амилаз, ксиланаз, протеаз).

Литература:

1. Андреев Н.Р., Колпакова В.В., Гольдштейн В.Г., К вопросу глубокой переработки зерна тритикале // Пищевая промышленность, 2018, №9. С.30-33.
2. Pasupuleti V.K., Demain A.L. (Eds.), *Protein Hydrolysates in Biotechnology, Hardcover, USA, 2010. 229 p. ISBN: 978-1-4020-6673-3.*

UDC 664.38

TWO-COMPONENT PROTEIN COMPOSITES FROM SECONDARY PRODUCTS OF TRITICALE GRAIN AND PEA FLOUR

Kulikov D.S., Gulakova V.A., Kolpakova V.V.

*All-Russian Research Institute for Starch Products – Branch of V.M. Gorbatoev Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Russia, Kraskovo
11 Nekrasov street, Kraskovo, Moscow region, 140051
e-mail: denismalah@mail.ru*

With the use of biotechnological techniques, food-grade protein composites with improved amino acid composition have been developed, in relation to raw materials. The raw materials were the secondary product of processing triticale grains to starch (extract, lock water) and whole ground pea flour. Chemical indicators and functional and technological properties of protein composites corresponded to indicators of commercial samples of dry wheat gluten and protein products from other grains.

Key words: triticale extract; pea flour; protein concentrates; enzyme preparations

It is known that cereal crops and protein preparations obtained on their basis are not balanced in amino acid composition (AAC). Based on the computer program developed by us, the ratios of protein components from the secondary products of triticale grain processing to starch (extract and starch B) and pea flour to create two-component composites with improved AAC were calculated. For the first three limiting amino acids, triticale grains (lysine, threonine, methionine + cystine), taking into account their mass fraction of 100 g of the product, mass fraction of protein in the product (in%) and the "reference" scale of the FAO / WHO (1973), are calculated amino acid scores and experimentally confirmed that the triticale grain is poor in lysine, threonine, sulfur-containing amino acids, and peas in methionine + cystine. When balancing proteins of triticale extract (TE) with pea proteins with a ratio by mass fraction, respectively, 1:3 ÷ 1:5, the sulfur-containing amino acids in composites did not exceed 70%. However, threonine fasting was close to 100%, lysine - over 100%. Composites were isolated according to the previously developed scheme by the liquid biotechnological method using enzyme preparations (EP) [1], which exclude the destruction of the structure and composition of the protein fractions of the raw material, in contrast to acids and alkalis [2]. EPs were obtained from Novozymes: Shearzym 500 L with xylanase activity, Viscoferm L with cytolytic activity, Fungamyl 800 L and AMG 300 L with amylase and glucoamylase activity, respectively, proteolytic EP Distizym Protacid from Erbslon. Indicators of the composition and functional properties of protein composites (PC) are given in table. 1. The preparations had a high mass fraction of protein (75-80%), the other indicators also corresponded to the group "Concentrates". All indicators are similar to those of dry wheat gluten. Significant differences in performance, depending on the different ratio of proteins, were not found.

Table 1. The chemical composition of protein composites.

The ratio of protein TE and pea flour in the composition of PC	Moisture, %	Mass fraction, % on DS			
		Protein Nx6.25	Lipids	Ash	Carbohydrates
1:3	2,90±0,04	80,40±1,03	1,97±0,04	3,53±0,06	14,10±1,0
1:5	4,80±0,03	75,44±0,09	4,94±0,20	2,93±0,3	16,73±0,7
	Functional properties				
	Solubility, %	WBC, %	FBC, %	FEC, %	
1:3	0,39±0,05	230±2	131±0,5	45,0±1,0	
1:5	0,13±0,03	263±1	131±0,0	45,0±0,0	

Note: WBC - water binding capacity, FBC - fat binding capacity, FEC - fat emulsifying capacity

As a result, the biocatalytic process of obtaining food protein composites from TE and pea flour with a complementary amino acid composition using hydrolytic EP (cellulases, amylases, xylanases, proteases) was carried out.

References:

1. Shelepina N.V. Use of pea processing products in food technologies. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. Russia*, vol. 6, no 3, pp. 110–118, 2016. DOI: 10.21285/2227-2925-2016-6-4-110–118
2. Pasupuleti V.K., Demain A.L. (Eds.), *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, Hardcover, USA, 2010. 229 p. ISBN: 978-1-4020-6673-3.

УДК 663.5: 663.05: 66.081.6

УЛЬТРАКОНЦЕНТРАТ ЗЕРНОДРОЖЖЕВОЙ - ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СУБСТРАТ, КОРМОВАЯ И ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА ИЗ БАРДЫ

Кудряшов В.Л., Алексеев В.В., Маликова Н.В., Погорельская Н.С.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия, 111033, Москва, ул. Самокатная, 46
e-mail: vera_vikir@mail.ru

Разработана на основе баромембранных процессов технология производства из зерновой барды жидкого ультраконцентрата зернодрожжевого с повышенным содержанием биологически активных веществ. Показаны эффективность и области его использования в субстратах микробиологических производств, а также в качестве кормовых и пищевых добавок.

Ключевые слова: баромембранные процессы, ультрафильтрация, обратный осмос, зерновая барда, субстрат, кормовые добавки, пищевые добавки

В себестоимости биопрепаратов значительную долю в затратах (порядка 30%) составляют субстраты, в которые часто входит кукурузный экстракт (КЭ).

К н. вр. в лаборатории мембранной технологии (ЛМТ) ВНИИПБТ создана технология производства из зерновой барды ультраконцентрата зернодрожжевого (УК ЗД). При более низкой его цене по содержанию аминного азота, глюкозы и др. биологически активных веществ (БАВ) он превышает КЭ (за счет содержания в дополнение к растительному белку гидролизата спиртовых дрожжей).

УК ЗД (ТУ 9182-276-00008064-00. Гигиеническое заключение Минздрава РФ № 77.99.9.916.П.13943.8.00) получается из барды с применением баромембранных процессов (БМП): ультрафильтрации (УФ) и обратного осмоса (ОО) [1].

В ависимости от используемого оборудования, УК ЗД содержит: от 35 до 70 % сухих веществ (СВ), в том числе более 55 % растворимых белков (аминокислот, полипептидов), витамины В₁, В₂, В₃, В₄, В₅, В₆, В₁₂, биотин, фолиевую и парааминобензойную кислоту (витамин В₁₀), микроэлементы и др. БАВ.

Эффективность использования УК ЗД вместо КЭ доказана нами и соисполнителями при культиви-

ровании: *L.lactis* - продуцента низина, *Pr.shermanii* - продуцента супероксиддисмутазы (СОД), продуцента проинсулина, бифидобактерий и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Так при биосинтезе последних с использованием УК ЗД осмочувствительность дрожжей сокращается в 2 раза, а выход и подъемная сила повышаются на 7 и 10 %, соответственно. Биохимический состав УК ЗД показывает перспективу его использования также взамен КЭ и при микробиосинтезе ферментов, органических кислот, аминокислот, ветпрепаратов, заквасок, мицелиальных грибов, азотфиксирующих бактерий и антибиотиков.

УК ЗД является перспективной кормовой добавкой, в том числе: для замены (до 50%) дорогого сухого обезжиренного молока (СОМ) в стандартных комбикормах и заменителях цельного молока (ЗЦМ); как обогатителя при кормлении дойного стада путем смешивания со специальными раскислителями и наполнителями; в качестве консерванта-обогапителя при силосовании кормов и скармливании различных жомов и шротов; в рецептурах новых ЗЦМ и комбикормах-стартерах для телят в смеси с ферментированными гидролизатами кукурузных зародышей, глютенном, соевым молоком, а также проросшими зерновыми.

Доказано, что использование УК ЗД целесообразно и эффективно также в качестве различных пищевых добавок (улучшителей, подкислителей, натурпленного коричневого красителя, консервантов и обогатителей пищи БАВами и т. д.), что позволяет одновременно сократить трехзвенную трофическую цепь питания - растение → животное → человек, до двухзвенной - растение → человек. При этом наряду с обогащением белками, витаминами и др. БАВами при использовании УК ЗД в производстве мясных, хлебобулочных, мучных кондитерских и макаронных изделий; кваса, пива, соков, кисломолочных напитков и др. продуктов питания ускоряются соответствующие технологические процессы, повышается выход, сокращаются дозировки дрожжей и заквасок, улучшаются окраска, органолептика и хранимоспособность.

В Пятигорской фармацевтической академии создана технология производства из зерновой барды антиоксидантов и гастроэнтерологических добавок, относящихся к лечебно-профилактическим БАДам.

Сотрудники ЛМТ заинтересованы во внедрении производства УК ЗД и сотрудничестве в продолжении НИР как по его производству так и использованию.

НИР для подготовки рукописи проведены за счет субсидии на выполнение госзадания по Программе Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (тема № 0529-2019-0066).

Литература:

1. Кудряшов В.Л. Производство и использование жидкого ультраконцентрата из барды // Ликероводочное производство и виноделие. - 2012. - №11-12. - С.18-20.

UDC 663.5: 663.05: 66.081.6

ULTRACONCENTRATE GRAIN AND YEAST - PROMISING SUBSTRATE, FEED AND FOOD ADDITIVE OF BARDS

Kudryashov V.L., Alekseev V.V., Malikova N.V., Pogorzhefskaya N.S

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology - branch FGBUN "FITS nutrition, biotechnology and food safety" Moscow, Russia, 111033, Moscow, Samokatnaya str., 4b
e-mail: vera_vikir@mail.ru

Developed based on baromembrane processes production technology of grain bards liquid ultracentral zernotorgova increased with-holding of biologically active substances. The efficiency and the area of its use in the substrates of the microbiological industries and also as feed and food additives.

Key words: baromembrane processes, ultrafiltration, reverse osmosis, grain bard, substrate, feed additives, food additives

In the cost of biological products a significant share in the cost (about 30%) are substrates, which often include corn extract (CE).

To the present time in the laboratory of membrane technology (LMT) VNIIPBT created the production technology of grain concentrate ultraconcentrate from grain bards (UK GB). With its lower price in terms of the content of amino nitrogen, glucose and other biologically active substances (BAS), it exceeds CE (due to the content of alcoholic yeast in addition to the plant protein of the hydrolyzate).

UK GB (TU 9182-276-00008064-00. Hygienic conclusion of the Ministry of health of the RF №.77.99.9.916.P.13943.8.00) is obtained from bards using baromembrane processes (BMP): ultrafiltration (UF) and reverse osmosis (OO) [1].

Depending on the equipment used, the UK GB contains: from 35 to 70% dry substances (SV), including more than 55% soluble proteins (amino acids, polypeptides), vitamins B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₁₂, biotin, folic and paraaminobenzoic acid (vitamin B10), trace elements and other BAS.

The effectiveness of the use of the UK GB instead of CE has been proven by us and co-producers when cultivating: *L. lactis* - producer of nisin, *Pr.shermanii* - producer of superoxide dismutase (SOD), producer of proinsulin, bifidobacterium and *Saccharomyces cerevisiae*. So in the biosynthesis of the latter using UK GB yeast osmosensitivity is reduced by 2 times, and the yield and lift are increased by 7 and 10%, respectively.

Biochemical composition of UK GB shows a perspective of its use also instead of CE and when mikrobiosintez enzymes, organic acids, amino acids, veterinary preparations, yeast, filamentous fungi, nitrogen-fixing bacteria and antibiotics.

UK GB is a promising feed additive, including: for replacement (up to 50%) of expensive powdered skim milk (PSM) in standard mixed feeds and whole milk replacers (WMS); as a dresser when feeding dairy herd by mixing with special deoxidizers and fillers; as a preservative-enrichment agent in ensiling feed and feeding of various juices and cakes; in the recipes of new milk replacer and starter feed for calves in a mixture with fermented hydrolysates of corn germ, gluten, soy milk, as well as sprouted grains. It has been proved that the use of UK GB is also expedient and effective as various food additives (improvers, acidulants, natural brown dye, preservatives and food fortifiers with BAS, etc.), which allows reducing the three-unit trophic food chain - plant → animal → man, up to two-link - plant → man.

At the same time, along with the enrichment of proteins, vitamins and BAVS when using the UK GB in the production of meat, bakery, flour confectionery and pasta; kvass, beer, juices, sour-milk drinks and other food products are accelerated by the corresponding technological processes, the yield is increased, the dosages of yeast and ferments are reduced, the coloring, organoleptics and their storage ability are improved.

The Pyatigorsk Pharmaceutical Academy has created a technology for the production of grain bards of antioxidants and gastrointestinal supplements related to therapeutic and prophylactic additives.

Employees of the LMT are interested in cooperation to continue research in the field of production and use of the UK GB.

Studies for the preparation of the manuscript were carried out at the expense of subsidies for the implementation of the state assignment under the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2013-2020 (subject No. 0529-2019-0066).

References:

1. Kudryashov V.L. *Production and use of liquid ultraconcentrate from bards // Alcoholic beverage production and winemaking*. - 2012. - №11-12. - p.18-20.

УДК 573.6.086.83

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ИЗ БИОМАССЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПИВОВАРЕНИЯ

Юшина Е.А., Богуш В.И., Вакар А.А., Кротов Ю.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия
125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом.11
e-mail: mgupp@mgupp.ru

Обработка ячменя при производстве солода для пивоварения препаратом из биомассы микромицета *Mortierella alliciae* позволяет повысить надежность защиты зерна от патогенной микрофлоры при замачивании, проращивании и дальнейшей сушке за счет стимуляции его естественных иммунных реакций

Ключевые слова: иммуностимулятор, микромицет *Mortierella alliciae*, полиненасыщенные жирные кислоты, фитопатогенная микрофлора

Солод – это продукт искусственного проращивания злаковых культур, в основном, зерен ячменя.

При производстве пива солод является основным компонентом. Сорта пива, в которых высокие показатели качества, производятся из ячменного солода.

Получающийся при проращивании солод имеет высокую влажность (42-45%) и, поэтому, подвержен заражению различными видами плесеней.

Введение в замочную воду препарата, полученного из биомассы микромицета *Mortierella alliciae* по заданной технологии, расширяет арсенал иммуностимуляторов для зерна, пригодных к использованию в пищевых технологиях с высокой надежностью защиты зерна от фитопатогенной микрофлоры.

При производстве солода, предусматривающем замачивание зерна в присутствии иммуностимулятора, проращивание и сушку, в качестве иммуностимулятора можно использовать препарат, полученный следующим образом.

Сухую биомассу микромицета *Mortierella alliciae* экстрагируют неполярным экстрагентом, например, двуокисью углерода или гексана в надкритическом состоянии. На этой стадии отделяют первый экстракт, используемый в дальнейшем при получении препарата. Далее биомассу последовательно экстрагируют водой, щелочью, водой, кислотой, водой, щелочью и снова водой. Полученный после завершения всех перечисленных стадий экстрагирования твердый остаток, объединяют с первым экстрактом.

Приготовленный таким образом препарат содержит, в основном, хитозан и высшие полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновую и эйкозапентаеновую, которые обладают иммуностимулирующей активностью. Установлено, что в состав препарата не входят вещества, ингибирующие иммуностимулирующую активность хитозана, арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот, что позволяет использовать полученный препарат для защиты зерна от фитопатогенов без полной очистки веществ с заданной активностью от сопутствующих веществ. Так же в состав этого препарата не входят токсичные, мутагенные, канцерогенные и антипитательные вещества.

Зерно замачивают в воде, в которую вводят препарат, полученный по данной технологии. Количество препарата задают от 0,05 мг/т до 20 мг/т. Верхний предел установлен с учетом опытной проверки, которая показала, что при большей дозировке препарата напитки, полученные из такого солода, опалесцируют. Замоченное зерно проращивают и сушат с получением целевого продукта.

Соотношение ферментативных активностей такого солода, практически не отличается от необработанного контроля.

Напитки, в частности, пиво и квас, получаемые с использованием опытного солода, отличаются от контрольных образцов более высокой стойкостью пены, которая превосходит и эталонные напитки, полученные из солода по наиболее близкому аналогу.

Пример 1. Солод готовят из шестирядного ячменя при внесении в замочную воду 0,05 мг/т препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliciae*, полученного с использованием в качестве неполярного агента гексана, в качестве щелочи – едкого натра и соляной кислоты. Одновременно замоченную массу контаминируют спорами плесневых грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium* в количестве $1 \cdot 10^9$ спор/мл. Рост плесеней не обнаружен. После проращивания и сушки получен солод, стойкий к заплесневению в процессе хранения.

Пример 2. Солод готовят по примеру 1, но с использованием препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliciae* в количестве 0,1 мг/т, двуокиси углерода в качестве неполярного экстрагента, гидроокиси аммония в качестве щелочи и серной кислоты. Результат аналогичен 1.

Пример 3. Солод готовят по примеру 1, но с использованием препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliciae* в количестве 1,0 мг/т, азота в качестве неполярного экстрагента, едкого кали в качестве щелочи и плавиковой кислоты. Результат аналогичен примеру 1.

Пример 4. Солод готовят по примеру 1, но с использованием препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliciae* в количестве 10,0 мг/т, аргона – в качестве неполярного экстрагента, и уксусной кислоты. Результат аналогичен примеру 1.

Пример 5. Солод готовят по примеру 1, но с использованием препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliciae* в количестве 20,0 мг/т, смеси аргона и двуокиси углерода в соотношении по массе 1:5, в качестве неполярного экстрагента, гидроокиси аммония в качестве щелочи и азотной кислоты. Результат аналогичен примеру 1.

Таким образом, упрощается технология за счет использования нового иммуностимулятора, полученного из единственного вида сырья без высокой степени очистки веществ, обладающих иммуностимулирующей активностью, пригодного к применению в пищевых технологиях.

Литература:

1. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. Физиология растений. - М.: издательский центр «Академия», 2005.-640с.
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. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г. и др. Исследование синтеза арахидоновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахидоновой кислоты// Микробиология. 1996.- Т.65, вып.1.- с. 31-36
4. Кунце В. Технология солода и пива.- СПб.: Изд-во «Профессия». 2001.- 824 с.

УДК 573.6.086.83

IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY OF YIELD'S BIOMASS PREPARATIONS IN BREWERY TECHNOLOGY

Yushina E.A., Bogush V.I., Vakar A.A., Krotov Y.I.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Moscow State University of Food Production,
Moscow, Russia
125080, Moscow, Volokolamskoe highway, 11
e-mail: mgupp@mgupp.ru

Treatment of the barley during the production of malt for brewery by *Morierella allocate micromycete* biomass allows to increase the reliability of protection grains from pathogenic microflora during the soaking, pre-sprouting and further drying due to the stimulation of its native reactions.

Key words: immunostimulator, *Morierella allocate micromycete*, polyunsaturated fatty acids (PUFA), phytopathogenic microflora.

Malt is a farmed pre-sprouting product of grain crops, basically barley grains.

Malt is the main component in beer production. High quality sorts of beer are produced from malted barley.

Resulting pre-sprouting humidity of malt is 42-45%, so it is vulnerable to contamination by different kinds of molds.

If add obtained by adjusted technology *Morierella allocate micromycete* biomass preparation to steeping water, then we can expand a variety of grain immunostimulators, that are usable in nutrition technologies with high reliability of grain protection from phytopathogenic microflora.

During the malt production, which provides grain soaking with immunostimulator, pre-sprouting and drying, we can use a preparation, acquired in the following way, as immunostimulator.

Dry *Morierella allocate micromycete* biomass extract by non-polar extractant, for example by CO₂ or hexane in supercritical state. In this stage separate the first extract, that are used further in producing of preparation. After that biomass consistently extracted by water, alkali, water, acid, water, alkali and water in the end. After all received hard substance make dry and combine with the first extract.

Basically this produced preparation contains chitosan and PUFAs, including arachidonic and docosahexaenoic acids, that have immunostimulation activity. Reports that products that are inhibitors of immunostimulation activity of chitosan, arachidonic and docosahexaenoic acids are not included in preparation's composition, and this quality allows to use produced preparation for grain protection against phytopathogens without full decontaminating of substances. Also there are no toxic, mutagenic, carcinogenic or anti-nutritional products in composition of this preparation.

Grains are soaked in water in which there is a received preparation. Set a quantity of preparation from 0,05 mg/t to 20 mg/t. Upper limit was revealed empirically, and an experience showed that drinks made with bigger dose of preparation opesce. Soaked grains are pre-sprouting and drying after getting of target product.

Relation of malt enzyme activity does not almost differ from unprocessed one.

Drinks that are obtained with using of experience malt, beer and kvass in particular, differ from control samples by more stable foam, the foam exceed reference malt drinks, made of the closest analogue.

Example 1. Preparing malt from six-line barley by adding 0,05 mg/t *Morierella allocate micromycete* biomass preparation in steeping water, made with using hexane as non-polar agent, sodium hydroxide and hydrochloric acid. At the same time contaminating soaked mass be spores of *Aspergillus* and *Penicillium* molds 1·10⁹ spores/ml. Molds growth was not found. Molds resistant malt was obtained after pre-sprouting and drying.

Example 2. Preparing malt in the same way like in the Example 1, but by adding 0,1 mg/t *Morierella allocate micromycete* biomass preparation in steeping water, CO₂ as non-polar agent, ammonium hydroxide as an alkali, sulphuric acid. The results are similar to Example 1.

Example 3. Preparing malt in the same way like in the Example 1, but by adding 1,0 mg/t *Morierella allocate micromycete* biomass preparation in steeping water, nitrogen as non-polar agent, caustic potash as an alkali, hydrofluoric acid. The results are similar to Example 1.

Example 4. Preparing malt in the same way like in the Example 1, but by adding 10,0 mg/t *Morierella allocate micromycete* biomass preparation in steeping water, argon as non-polar agent, acetic acid. The results are similar to Example 1.

Example 5. Preparing malt in the same way like in the Example 1, but by adding 20,0 mg/t *Morierella allocate micromycete* biomass preparation in steeping water, mix of argon CO₂ in the ratio 1:5 as non-polar agent, ammonium hydroxide as an alkali, nitric acid. The results are similar to Example 1.

Therefore the technology is simplified by using new immunostimulator, that we can get from one kind of product without high decontaminating, which have immunostimulate activity, usable in nutritional technologies.

References:

1. Alekhina N.D., Balnokin Yu.V., Gavrilenko V.F. and others. *Physiology of plants*. - M.: Publishing Center "Academy", 2005. - 640s.
2. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. *Effect of lipids from mortierella hygrophila on plant resistance to phytopathogens* // *World J. of Mikrobiol. & Biotechnol.* 2002. - Vol.18. - P.165-167
3. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. and etc. *Study of the synthesis of arachidonic acid by the fungus of the genus Mortierella: a microbiological method of selection of arachidonic acid producers* // *Microbiology*. 1996. - T.65, issue 1. - p. 31-36
4. Kunc V. *Technology of malt and beer*. - SPb.: Publishing house "Profession". 2001. - 824 s.

УДК 663.52

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВИДА И КАЧЕСТВА ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ БАРДЫ, ОБРАЗУЮЩЕЙСЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА

Туршатов М.В., Соловьев А.О., Кононенко В.В., Кривченко В.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 влиянию вида и качества зерновых культур, на показатели получаемой барды. По результатам исследования разработаны требования к контролю качества зернового сырья и способам его глубокой очистки от примесей для получения кормопродуктов высокого качества

Ключевые слова: зерновое сырье, посторонняя микрофлора, послеспиртовая барда, сырой протеин, сухой кормопродукт

Существующие нормативы на сырье для спиртового производства разработаны в 70-е годы прошлого века. Для получения спирта предписывалось использование зерна и картофеля не соответствующих требованиям применения на продовольственные цели. Технология переработки преимущественно была однопродуктовой, ориентированной в первую очередь, на получение спирта. Современные условия обязывают производителей этилового спирта осуществлять комплексную, безотходную переработку зернового сырья с получением на основе барды сухих продуктов. Причем последние исследования свидетельствуют об эффективности их применения не только в качестве кормопродуктов, но и как пищевой добавки - источника клетчатки, обогащенной аминокислотами, витаминами и микроэлементами. Это обязывает пересмотреть существующие и разработать новые требования на сырье. Для гарантированного обеспечения заданного качества и безопасности продукции требуется разработка научно-обоснованных требований на зерно и способы его очистки для применения в спиртовом производстве. [1]

Для этого проведены исследования по влиянию вида зерновых культур (рожь, пшеница, кукуруза и др.), его качества (продовольственное, фуражное, дефектное) на показатели получаемой барды. [2-3] Установлены выход и основные показатели питательной и кормовой ценности получаемых продуктов в зависимости от вида применяемой культуры. Установлена зависимость показателей безопасности барды, применяемой для пищевых и кормовых целей, от характеристик качества и кондиционности применяемого зернового сырья. Показано, что посторонняя микрофлора, попадая в спиртовое производство вместе с некондиционным сырьем, снижает продуктивность брожения и способствует накоплению в полупродуктах токсичных метаболитов, которые негативно сказываются как на качестве спирта, так и на качестве барды. По результатам исследования разработаны требования к контролю качества зернового сырья и способам его глубокой очистки от примесей, в том числе и микробиологических. [4-5]

Научно-исследовательская работа по подготовке тезисов проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (№ 0529-2019-0066).

Литература:

1. Кононенко В.В., Туршатов М.В., Леденев В.П., Соловьев А.О., Кривченко В.А., Моисеева Н.Д., Базилов В.И. Эффективность применения озона для обеззараживания зерна в спиртовом производстве // Пиво и напитки. - 2017. - № 5. - С. 20-22.
2. Серба Е.М., Белокопытова Е.Н., Римарева Л.В., Игнатова Н.И. Исследование качества концентрированного суслу, приготовленного на основе различных видов зерновых культур // В сборнике: «От биопродуктов к биоэкономике» Материалы II межрегиональной научно-практической конференции (с международным участием). Правительство Алтайского края. - 2018. - С. 205-209.
3. Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Серба Е.М., Шелехова Н.В., Веселовская О.В., Абрамова И.М., Римарева Л.В. Исследование различных сортов тритикале для использования их в спиртовом производстве // Пиво и напитки. - 2014. - № 6. - С. 14-18.
4. Туршатов М.В., Моисеева Н.Д., Шлеленко Л.А. Использование сухой зерновой барды на пищевые цели // Ликероводочное производство и виноделие. - 2010. - № 7. - С. 18-19.
5. Степанов В.И., Поляков В.А., Амелякина М.В., Римарева Л.В., Иванов В.В., Шариков А.Ю., Пономарев В.В., Бикбов Т.М. Способ получения этилового спирта и белкового продукта из зернового сырья // Патент на изобретение *RUS 2542389* 30.01.2013

UDC 663.52

STUDY OF THE EFFECT THE TYPE AND QUALITY OF GRAIN RAW MATERIALS ON THE INDICATORS OF THE BARD, FORMED IN THE MANUFACTURE OF ETHYL ALCOHOL

Turshatov M.V., Solovyov A.O., Kononenko V.V. , Krivchenko V.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.
e-mail: lab78@mail.ru

Researches on influence of a type and quality of grain crops, on indicators of received stillage are conducted. By results of a research requirements to quality control of grain raw materials and ways of its deep cleaning of impurity are developed for receiving high quality fodder

Key words: grain raw materials, extraneous microflora, distillery bard, crude protein, dry feedstuff.

Existing standards for raw materials for alcohol production were developed in the 70s of the last century. To obtain alcohol prescribed the use of grain and potatoes do not meet the requirements of the application for food purposes. The processing technology was mainly single-product, focused primarily on the production of alcohol. Modern conditions oblige ethyl alcohol producers to carry out a complex, waste-free processing of grain raw materials with the production of dry products based on bards. Moreover, recent studies have shown the effectiveness of their use not only as feedstuffs, but also as a food additive - a source of fiber, enriched with amino acids, vitamins and trace elements. This obliges to review existing and develop new requirements for raw materials. To ensure the maintenance of a given quality and safety of products requires the development of scientifically-based requirements for grain and methods for its purification for use in the alcohol industry. [1] To do this, studies have been conducted on the effect of the type of grain crops (rye, wheat, corn, etc.), its quality (food, fodder, defective) on the bards produced. [2-3] The yield and main indicators of the nutritional and feed value of the products obtained were established depending on the type of culture used. The dependence of the safety indicators of bards, used for food and feed purposes, on the characteristics of quality of the used grain raw materials has been established. It is shown that extraneous microflora, getting into alcohol production with non-conforming raw materials, reduces the productivity of fermentation and contributes to the accumulation of toxic metabolites in semi-products, which adversely affect both the quality of alcohol and the quality of bards. According to the results of the study, the requirements for quality control of grain raw materials and methods for its deep cleaning of impurities, including microbiological ones, have been developed. [4-5]

The research work on the preparation of abstracts was carried out at the expense of subsidies for the state assignment under the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2013–2020 (No. 0529-2019-0066).

References:

1. Kononenko V.V., Turshatov M.V., Ledenev V.P., Solov'ev A.O., Krivchenko V.A., Moiseeva N.D., Bazikov V.I. Effektivnost' primeneniya ozona dlya obezrazhivaniya zerna v spirtovom proizvodstve // Pivo i napitki. - 2017. - № 5. - S. 20-22.
2. Serba E.M., Belokopytova E.N., Rimareva L.V., Ignatova N.I. Issledovanie kachestva koncentrirovannogo susla, prigotovlennogo na osnove razlichnykh vidov zernovykh kul'tur // V sbornike: «Ot bioproductov k bioehkonomike» Materialy II mezhregional'noj nauchno-prakticheskoy konferencii (s mezhdunarodnym uchastiem). Pravitel'stvo Altajskogo kraya. - 2018. - S. 205-209.
3. Overchenko M.B., Ignatova N.I., Serba E.M., Shelekhova N.V., Veselovskaya O.V., Abramova I.M., Rimareva L.V. Issledovanie razlichnykh sortov tritikale dlya ispol'zovaniya ih v spirtovom proizvodstve // Pivo i napitki. - 2014. - № 6. - S. 14-18.
4. Turshatov M.V., Moiseeva N.D., Shelenko L.A. Ispol'zovanie suhoj zernovoj bardy na pishchevye celi // Likerovodochnoe proizvodstvo i vinodelie. - 2010. - № 7. - S. 18-19.
5. Stepanov V.I., Polyakov V.A., Amelyakina M.V., Rimareva L.V., Ivanov V.V., Sharikov A.YU., Ponomarev V.V., Bikbov T.M. Spособ polucheniya ehtilovogo spirta i belkovogo produkta iz zernovogo syr'ya // Patent na izobretenie RUS 2542389 30.01.2013

УДК 579.67

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Ашихмина М.С., Забодалова Л.А.

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 191002, г. Санкт-Петербург, улица Ломоносова, д.9
e-mail: masha_ashikhmina@mail.ru; zabodalova@gmail.ru

Определены методы выделения микроорганизмов из растительного сырья. Получена культура молочно-кислых бактерий, штаммы которой были проверены на устойчивость к ингибирующим веществам.

Ключевые слова: выделение микроорганизмов, молочная промышленность, устойчивость микроорганизмов к ингибирующим веществам, выделение чистой культуры.

В пищевой промышленности микроорганизмы широко используются для получения различных продуктов. Молочнокислые бактерии составляют основную часть заквасочной микрофлоры, которая используется для производства кисломолочных продуктов. При длительном хранении и культивировании микроорганизмов происходит изменение их биохимических свойств, и как следствие, потеря производственной ценности. Селекция ведет к усовершенствованию штаммов, что в свою очередь способствует созданию и расширению производства новых продуктов, повышению их качества, а также сокращению длительности технологического процесса производства традиционных кисломолочных продуктов.

В ходе работы были изучены способы выделения микроорганизмов из растительного сырья, а также определены физико-химические показатели образовавшихся сгустков. Подобрана питательная среда для выделения чистой культуры и определены критические биохимические показатели выделенного штамма.

В работе был выделен штамм молочнокислых бактерий, обладающий довольно высокой активностью свертывания и терморезистентностью; предельная титруемая кислотность находится в пределах (110-120) °Т, а активная кислотность - (4,6-4,4).

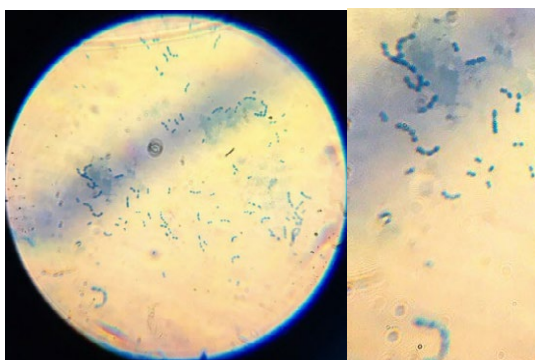


Рис. 1. Микроскопическая картина чистой культуры

Штамм не образует углекислоту, ацетоин и диацетил, а также каталазу; проявляет устойчивость к средам с фенолом, хлоридом натрия и желчью, не растет в среде, содержащей раствор метиленового голубого и чувствителен к среде с антибиотиками (бициллин, гентамицин, стрептомицин, левомицетин). Предположительно выделенный штамм можно классифицировать как термофильный стрептококк.

Исследования продолжаются, так как некоторые тесты занимают большое количество времени и требуют более детального рассмотрения.

Литература:

1. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М.: Пищ. Пром., 1975. – 255 с.

Статьи из журналов и сборников:

2. Дунаева С.Е., Оследкин Ю.С. статья «Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре *in vitro*: идентификация и возможная роль».

3. Артюхова С.И., Доцинская И.В., Бондарева Г.И. Исследование устойчивости молочнокислых стрептококков к антибиотикам // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 2-1. – С. 92-93;

4. Китаевская С.В. Современные тенденции отбора и идентификации пробиотических штаммов молочнокислых бактерий // Вестник Казанского технологического университета. – 2012 №17 стр. 184-188.

5. Харитонов Д.В. ВНИМИ в области производства заквасок и бактериальных концентратов / Д.В. Харитонов // Материалы Международной научно-практической конференции «Молочная индустрия мира и РФ». – М., 2011 – с. 45 – 55.

UDC 579.67

THE STUDY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM PLANT COMPONENTS

Ashikhmina M.S., Zabodalova L.A.

St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 191002, St.

Petersburg, Lomonosov Street, 9

e-mail: masha_ashikhmina@mail.ru; zabodalova@gmail.ru

We've set specific methods for the isolation of microorganisms from vegetable raw materials. We've got the culture of lactic acid bacteria, the strains of which have been tested for resistance to inhibitory substances.

Key words: isolation of microorganisms, dairy industry, resistance of microorganisms to inhibiting substances, isolation of pure culture.

Microorganisms are widely used to produce various products in the food industry. Being the main part of starter microflora, Lactic acid bacteria is used for the production of fermented milk products. With long-term preservation and cultivation of microorganisms there is a change in their biochemical properties, and, as a consequence, the loss of production values. Breeding leads to the improvement of strains, so it helps to create and increase new products, with better quality, as well as a reduction in the duration of the technological process for the making of target products.

The methods for isolating microorganisms from vegetable raw materials have been studied in the course of the work. Besides, the physicochemical parameters of the resulting clots have been determined. We've found the substratum to isolate a pure culture and set the critical biochemical parameters of the selected strain.

Thus, in this work, a strain of lactic acid bacteria with a sufficiently high activity, coagulation and thermal resistance has been got; its maximum titratable acidity is within (110-120) ° T, and the active acidity is (4.6-4.4).

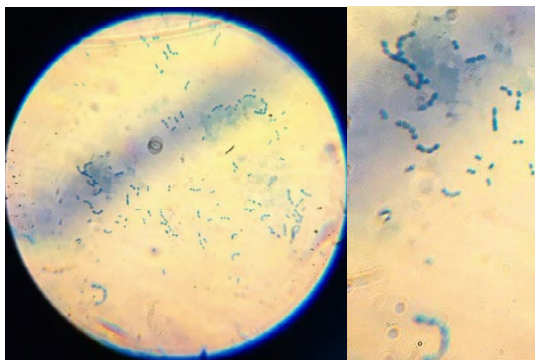


Fig. 1. Microscopic picture of pure culture

The strain does not form carbon dioxide, acetoin and diacetyl, as well as catalase; it is resistant to media with phenol, sodium chloride and bile, does not grow in the medium in methylene blue solution and is sensitive to the environment with antibiotics (bicillin, gentamicin, streptomycin, levomycetin). We consider that, the isolated strain can be classified as a thermophilic streptococcus. Up -to-now our research continues, because some tests take a large amount of time and require more detailed consideration.

References:

1. Bannikova L.A. Selection of lactic acid bacteria and their application in the dairy industry. –M.: Food. Prom., 1975. –255 p.

Articles from magazines and collections:

2. Dunaeva S.E., Osledkin Yu.S. article "Bacterial microorganisms associated with plant tissue in vitro culture: identification and possible role."

3. Artyukhova S.I., Doshchinskaya I.V., Bondareva G.I. Study of the resistance of lactic streptococci to antibiotics // International Journal of Experimental Education. - 2015. - № 2-1. - pp. 92-93;

4. Kitayevskaya S.V. Modern trends in the selection and identification of probiotic strains of lactic acid bacteria // Bulletin of Kazan Technological University. - 2012 №17 p. 184-188.

5. Kharitonov D.V. VNIMI in the field of production of starter cultures and bacterial concentrates / D.V. Kharitonov // Proceedings of the International scientific-practical conference "Dairy industry of the world and the Russian Federation." - M., 2011 - p. 45 - 55.

УДК 663.5

К ВОПРОСУ О ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РОССИЙСКОГО ВИСКИ

Абрамова И.М., Головачева Н.Е., Морозова С.С., Шубина Н.А., Галлямова Л.П.

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. 4Б
e-mail: golovacheva.otlvp@mail.ru

Рассматривается возможность производства российского виски по ускоренной технологии, позволяющей получать продукт с высокими органолептическими показателями и с составом летучих микропримесей, наиболее характеризующих тона выдержанного виски.

Ключевые слова: виски, летучие микропримеси, ароматические альдегиды, сивушные масла, сложные эфиры, органолептические показатели

В последнее время у потребителей в России среди спиртных напитков большую популярность приобретает виски [1]. Лучшие сорта виски производят в Шотландии и Ирландии по классической технологии, включающей получение зернового дистиллята, выдержку его в дубовых бочках из определенных сортов дуба в течение 3 лет, после чего виски приобретают характерные аромат и вкус. Импортный виски – напиток дорогостоящий, ведь классическая технология производства весьма длительная и трудоемкая.

В России с введением ГОСТ 33281-2015 «Виски. Технические условия», ГОСТ 33880-2016 «Напитки спиртные. Термины и определения» появилась возможность производства российского виски из зерно-

вых дистиллятах, в том числе отечественного производства, что весьма актуально, так как может решить вопрос импортозамещения.

Вкус и аромат виски определяют более 800 различных идентифицированных химических компонентов. Массовая концентрация летучих микропримесей виски различных регионов происхождения (Шотландия, США, Ирландия) колеблется в широких пределах (таблица 1).

Таблица 1. Массовая концентрация летучих компонентов

Наименование показателя	По литературным источникам [4]	ГОСТ 33281-2015	В образцах виски по ускоренной технологии
Массовая концентрация альдегидов в 1 дм ³ , безводного спирта, мг	12,0-308,1 (ацетальдегид)	10-350	13,0-23,7
Массовая концентрация сивушного масла, в 1 дм ³ , безводного спирта, мг	948,5-5855,3	500-6000	1586,1-2414,0
Массовая концентрация сложных эфиров, в 1 дм ³ , безводного спирта, мг	47,0-897,6	50-1500	61,8-235,5
Объемная доля метилового спирта в пересчете на безводный спирт, %	0,0065-0,022	не более 0,05	0,018-0,032

Разработанный в институте ускоренный способ производства виски [2] с использованием щепы, обработанной различными способами, в том числе полученную после обработки ферментным препаратом Брюзайм BGX [3] позволяет получить виски с высокими органолептическими показателями, по массовой концентрации альдегидов, сивушного масла, сложных эфиров соответствующие требованиям ГОСТ 33281-2015 «Виски. Технические условия» (таблица 1) и с составом фенольных и фурановых соединений, наиболее характеризующие тона выдержанного виски (таблица 2).

Исследование состава фенольных и фурановых соединений, показало, что в образцах виски, приготовленных по ускоренной технологии, присутствуют ароматические альдегиды, наиболее характеризующие тона выдержанного виски (таблица 2).

Таблица 2. Массовая концентрация ароматических альдегидов

Наименование показателя	Содержание, мг/дм ³
Синаповый альдегид	2,0-4,5
Кониферилловый альдегид	2,8-4,8
Сиреневый альдегид	5,1-12,3
Ванилин	3,0-6,1

Результаты исследования катионного и анионного состава показали, что в образцах, присутствуют (мг/дм³): натрий (0,5-1,5), калий (7,1-9,9), кальций (0,1-0,4), магний (0,1-2,4), аммоний (0,1-0,2) сульфаты (0,6-1,0). Массовая концентрация фторидов, хлоридов, нитритов, нитратов, фосфатов менее 0,1 мг/дм³. Содержание железа находится в пределах 0,0047-0,0187, что не превышает предельно допустимую величину -1,0 мг/дм³, установленную требованиями ГОСТ 33281-2015.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности получения виски путем настаивания с дубовой щепой с физико-химическими и органолептическими показателями, соответствующими требованиям ГОСТ 33281-2015 «Виски. Технические условия».

Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук (тема № 0529-2019-0066).

Литература:

1. Абрамова И.М., Головачева Н.Е., Морозова С.С., Поляков В.А., Медриш М.Э., Галлямова Л.П., Мартиросян А.С. О возможности приготовления виски по ускоренной технологии // Сборник научных трудов «Современные биотехнологические процессы, оборудование и методы контроля спирта и спиртных напитков». – М: ФГБУН ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи. – 2017. – с. 192-197.

2. Абрамова И.М., Воробьева Е.В., Морозова С.С., Мартиросян А.С., Поляков В.А., Галлямова Л.П., Шубина Н.А. Способ обработки дубовой клепки, используемой при созревании висковых и им подобных дистиллятов// Патент РФ № 2612785, 13.03.2017.
3. Абрамова И.М., Воробьева Е.В., Морозова С.С., Мартиросян А.С., Поляков В.А., Галлямова Л.П., Шубина Н.А. Способ производства виски// Патент РФ № 2612917, 13.03.2017.
4. Бурачевский И.И., Воробьева Е.В., Веселовская О.В., Галлямова Л.П. Происхождение, классификация и технология приготовления виски//Производство спирта и ликероводочных изделий.—2013. —№1.—С. 9-14.

UDC 663.5

TO THE QUESTION OF TECHNOLOGY FOR THE RUSSIAN WHISKEY

Abramova I.M., Golovacheva N.E., Morozova S.S., Shubina N.A., Galliamova L.P.

*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*

The possibility of producing Russian whiskey using accelerated technology is being considered, which makes it possible to obtain a product with high organoleptic characteristics and with the composition of volatile trace contaminants that most characterize the tone of aged whiskey

Key words: whisky, volatile micro-impurities, aromatic aldehydes, fusel oils, esters, organoleptic characteristics

Recently, whiskey has become very popular among consumers in Russia among alcoholic beverages [1]. The best varieties of whiskey produced in Scotland and Ireland on the classical technology, including the production of grain distillate, aging it in oak barrels from certain varieties of oak for 3 years, after which the whiskey acquires a characteristic aroma and taste. Imported whiskey is an expensive drink, because the classical technology of production is very long and time-consuming.

In Russia, with the introduction of GOST 33281-2015 "Whiskey. Technical conditions", GOST 33880-2016 "Alcoholic beverages. The terms and definitions" appeared the possibility of producing Russian whiskey from grain distillates, including domestic production, which is very important, since it can solve the issue of import substitution.

The taste and aroma of whiskey define more than 800 different identified chemical components. The mass concentration of volatile micro-impurities of whiskey of different regions of origin (Scotland, USA, Ireland) varies widely (table 1).

Developed at the Institute an accelerated method of whiskey production [2] using chips, processed in various ways, including obtained after treatment with an enzyme preparation Bryuzaym BGX [3] allows you to get whiskey with high organoleptic characteristics, the mass concentration of aldehydes, fusel oil, esters meet the requirements of GOST 33281-2015 "Whiskey. Specifications" (table 1) and the composition of phenolic and furan compounds, the most characteristic tone aged whiskey (table 2).

Table 1. Mass concentration of volatile components

Name of indicator	According to literary sources [4]	GOST 33281-2015	In the samples at accelerated technology
Mass concentration of aldehydes in 1 dm ³ , anhydrous alcohol, mg	12,0-308,1 (acetaldehyde)	10-350	13,0-23,7
Mass concentration of fusel oil, in 1 dm ³ , anhydrous alcohol, mg	948,5-5855,3	500-6000	1586,1-2414,0
Mass concentration of esters in 1 dm ³ of anhydrous alcohol, mg	47,0-897,6	50-1500	61,8-235,5
Volume fraction of methyl alcohol in terms of anhydrous alcohol, %	0,0065-0,022	no more than 0,05	0,018-0,032

The study of the composition of phenolic and furan compounds showed that in samples of whiskey prepared

by accelerated technology, there are aromatic aldehydes that most characterize the tone of aged whiskey (table 2).

Table 2. Mass concentration of aromatic aldehydes

Name of indicator	Content, mg/dm ³
Synaptic aldehyde	2,0-4,5
Coniferyl aldehyde	2,8-4,8
Lilac aldehyde	5,1-12,3
Vanillin	3,0-6,1

The results of the study of cationic and anionic composition showed that the samples present (mg/dm³): sodium (0,5-1,5), potassium (7,1-9,9), calcium (0,1-0,4), magnesium (0,1-2,4), ammonium (0,1-0,2) sulfates (0,6-1,0). The mass concentration of fluorides, chlorides, nitrites, nitrates, phosphates is less than 0,1 mg/dm³. The iron content is in the range of 0,0047-0,0187, which does not exceed the maximum permissible value of -1,0 mg/dm³, established by the requirements of GOST 33281-2015.

The results allow us to conclude about the possibility of obtaining whiskey by infusing with oak chips with physico-chemical and organoleptic characteristics corresponding to the requirements of GOST 33281-2015 "Whiskey. Technical conditions".

The research was carried out at the expense of subsidies for the implementation of the state task in the framework of the program of Basic scientific research of the state academies of Sciences (theme №0529-2019-0066).

References:

1. Abramova I.M., Golovacheva N.Ye., Morozova S.S., Polyakov V.A., Medrish M.E., Gallyamova L.P., Martirosyan A.S. O vozmozhnosti prigotovleniya viski po uskorennoy tekhnologii//Sbornik nauchnykh trudov «Sovremen-nyye biotekhnologicheskiye protsessy, oborudovaniye i metody kontrolya spirta i spirtnykh napitkov». – M: FGBUN FITS pitaniya, biotekhnolo-gii i bezopasnosti pishchi. – 2017. –s. 192-197.
2. Abramova I.M., Vorob'yeva Ye.V., Morozova S.S., Martirosyan A.S., Polyakov V.A., Gallyamova L.P., Shubina N.A. Sposob obrabotki dubovoy klepki, ispol'zuyemoy pri sozrevanii viskovykh i im podobnykh distillyatov// Patent RF № 2612785, 13.03.2017.
3. Abramova I.M., Vorob'yeva Ye.V., Morozova S.S., Martirosyan A.S., Polyakov V.A., Gallyamova L.P., Shubina N.A. Sposob proizvodstva viski// Patent RF № 2612917, 13.03.2017.
4. Burachevskiy I.I., Vorob'yeva Ye.V., Veselovskaya O.V., Gallyamova L.P. Proiskhozhdeniye, klassifikatsiya i tekhnologiya prigotovleniya vis-ki//Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy. –2013. –№1. –S. 9-14.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77

КОМПЛЕКСЫ ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА С ЛИПОСОМАМИ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА, НАПОЛНЕННЫМИ ТРИГЛИЦЕРИДАМИ РЫБЬЕГО ЖИРА: СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Чеботарёв С.А.¹, Гуреева М.Д.¹, Самусева Ю.В.¹, Зеликина Д.В.², Makasa Akwebiwa J.¹, Антипова А.С.², Мартиросова Е.И.², Семёнова М.Г.².

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия. 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия. 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4.
e-mail: sportsislive@gmail.com

Установлена взаимосвязь между функциональными свойствами (растворимостью в водной среде, пенообразующей способностью) и структурными, а также термодинамическими параметрами комплексов изолята сывороточных белков молока с липосомами фосфатидилхолина, наполненными триглицеридами рыбьего жира, содержащими > 60% длинноцепочечных омега-3 жирных кислот.

Ключевые слова: пенообразующая способность, изолят сывороточных белков молока, липосомы фосфатидилхолина, триглицериды рыбьего жира, эссенциальные омега-3 жирные кислоты, супрамолекулярный комплекс, структура, термодинамические параметры

Основными объектами нашего исследования являлись комплексы липосом фосфатидилхолина (ФХ), наполненных триглицеридами рыбьего жира (РЖ), с изолятом сывороточных белков молока (ИСБ) в их нативном и частично денатурированном при 60 °С (10 мин) и 70 °С (10 мин) состоянии [1, 2]. Методом лазерного светорассеяния в статическом, динамическом и электрофоретическом режимах были охарактеризованы как структурные (молярная масса, размер, архитектура, плотность, дзета-потенциал), так и термодинамические параметры (термодинамическое сродство к водной среде) таких комплексов. Выявлены основные взаимосвязи между этими параметрами и такими функциональными свойствами комплексов, как растворимость в воде и пенообразующая способность. Пенообразующую способность изучаемых образцов оценивали, измеряя: (1) скорость перехода в пену одинакового объема раствора образца; (2) высоту пены; (3) скорость дренажа водной среды из пены и (4) время полураспада пены. Дисперсность пен и их стабильность во времени фиксировались при помощи цифровой фотокамеры. Проведено сравнение пенообразующих способностей комплексов и составляющих их отдельных компонентов, а именно липосом (ФХ+РЖ) и изолятов сывороточных белков (ИСБнативный, ИСБ60°С, ИСБ70°С).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

Литература:

1. Nikolaidis A., Andreadis M., Moschakis T. Effect of heat, pH, ultrasonication and ethanol on the denaturation of whey protein isolate using a newly developed approach in the analysis of difference-UV spectra // *Food Chemistry*.-2017.- 232.- P. 425-433.
2. Palmina N.P., Maltseva E.L., Binyukov V.I., Kasparov V.V., Antipova A.S., Semenova M.G. Structural State and Form of Free and Biopolymer-Encapsulated Phosphatidylcholine Liposomes in the Absence and Presence of Natural Plant Antioxidants // *Biophysics*.-2018. -Vol. 63.- No. 1.- P. 52-58.

UDK 544.3.03: 544.032: 544.77

COMPLEXES OF WHEY PROTEIN ISOLATE WITH LIPOSOMES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LOADED WITH TRIACYLGLYCEROLS OF FISH OIL: STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES

Chebotarev S.A.¹, Gureeva M.D.¹, Samuseva Y.V.¹, Zelikina D.V.², Makasa Akwebiwa J.¹, Antipova A.S.², Martirosova E.I.², Semenova M.G.²

¹ D. I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
 125047 Moscow, Miusskaya sq., 9

² 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 relationships have been elucidated between functional properties (solubility in aqueous medium, foaming capacity) and both the structural and thermodynamic parameters of the complexes of whey protein isolate with liposomes of phosphatidylcholine loaded with triacylglycerols of fish oil that contains > 60% of the long-chain omega-3 fatty acids.

Key words: foaming capacity, whey protein isolate, liposomes of phosphatidylcholine, triacylglycerols of fish oil, essential omega-3 fatty acids, supramolecular complex, structure, thermodynamic parameters

The major objects of our investigation were complexes of liposomes of phosphatidylcholine (PC) loaded with triacylglycerols of fish oil (FO) with both native and partially denatured at 60 °С (10 min) or at 70 °С (10 min) whey protein isolate (WPI) [1, 2]. Both structural (molar mass, size, architecture, density, zeta-potential) and thermodynamic (thermodynamic affinity for aqueous medium) parameters of the complexes have been measured using a combination of static, dynamic and electrophoretic light scattering. The main relationships have been elucidated between these parameters and such functional properties of the complexes as their both solubility in aqueous medium and foaming capacity. The foaming capacity of the sample solutions has been estimated by

measuring the following: (1) the velocity of foaming of the same volume of the sample solutions; (2) the foam height; (3) the velocity of the drainage of aqueous medium from the foams and (4) the foam half-life time. The changes of the foam both dispersity and stability with time were characterized using a digital photo camera. A comparison has been made between the foaming capacities of the complexes and the components that were comprised them (PC+FO liposomes; native and partially denaturated WPI (WPI_{native}, WPI_{60 °C}, WPI_{70 °C})).

This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 18-316-00111.

References:

1. Nikolaidis A., Andreadis M., Moschakis T. Effect of heat, pH, ultrasonication and ethanol on the denaturation of whey protein isolate using a newly developed approach in the analysis of difference-UV spectra // *Food Chemistry*.-2017.- 232.- P. 425-433.
2. Palmina N.P., Maltseva E.L., Binyukov V.I., Kasparov V.V., Antipova A.S., Semenova M.G. Structural State and Form of Free and Biopolymer-Encapsulated Phosphatidylcholine Liposomes in the Absence and Presence of Natural Plant Antioxidants // *Biophysics*.-2018. -Vol. 63.- No. 1.- P. 52–58.

УДК 663.5

КОНТРОЛЬ ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА СПИРТНЫХ НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ ВЫДЕРЖАННЫХ ЗЕРНОВЫХ ДИСТИЛЛЯТОВ

Абрамова И.М., Медриш М.Э., Савельева В.Б., Матросова Н.В., 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, д. 4Б
e-mail: medrishm@mail.ru

Разработаны методики определения летучих органических примесей, фенольных и фурановых соединений в спиртных напитках на основе зерновых дистиллятов с применением методов газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: спиртные напитки, зерновые дистилляты, летучие органические примеси, фенольные соединения, фурановые соединения, газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография

В настоящее время спиртные напитки, полученные из зерновых дистиллятов, приобретают все большую популярность среди населения. Качество этих напитков зависит от различных факторов: сырья, технологии, выдержки. На всех стадиях технологического процесса производства зерновых дистиллятов и напитков на их основе образуются летучие и нелетучие органические примеси, которые участвуют в формировании органолептических свойств напитков.

Летучие компоненты (сивушные масла, альдегиды, эфиры) в зерновых дистиллятах и спиртных напитках на их основе в большей степени влияют на качество продукции, формируя их вкус и аромат. При этом летучие примеси могут переходить в дистиллят при перегонке, а также образовываться в процессе выдержки.

Нелетучие компоненты (фенольные и фурановые соединения) в спиртных напитках из выдержанных зерновых дистиллятов образуются в процессе хранения продукта в контакте с древесиной дуба и являются одними из основных маркеров, позволяющих выявлять фальсифицированную продукцию. При выдержке проходят реакции, которые формируют новые ароматы, и наоборот, удаляют другие химические соединения.

Одной из главных задач в области производства спиртных напитков является повышение уровня их качества и борьба с фальсификацией.

Наиболее прогрессивными методами, позволяющими оптимизировать процедуру контроля качества спиртных напитков, являются методы высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии. Поэтому разработка методик определения летучих и нелетучих органических примесей - приоритетная задача для контроля подлинности и качества спиртных напитков на основе выдержанных зерновых дистиллятов.

Нелетучие примеси, вносящие наибольший вклад в органолептические и физико-химические качества спиртных напитков при подобранных условиях могут быть определены одновременно экспресс-методом

определения содержания фенольных и фурановых соединений. Этот метод позволяет устанавливать сроки выдержки зерновых дистиллятов, а также причины осадкообразования, и обеспечивать возможность выявления фальсифицированной алкогольной продукции.

Методика определения летучих органических примесей (ацетальдегид, этилацетат, ацеталь, метанол, 1-пропанол, изобутанол, 2-метилбутанол, 3-метилбутанол, фурфурол) позволяет определить количество и соотношение летучих компонентов для установления качества и подлинности данного вида продукции.

Из литературных источников известно, что по соотношению 2-метилбутанола к 3-метилбутанолу можно идентифицировать виски с целью выявления фальсифицированной продукции. В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные условия разделения изоамилового спирта на изомеры с применением метода газовой хроматографии.

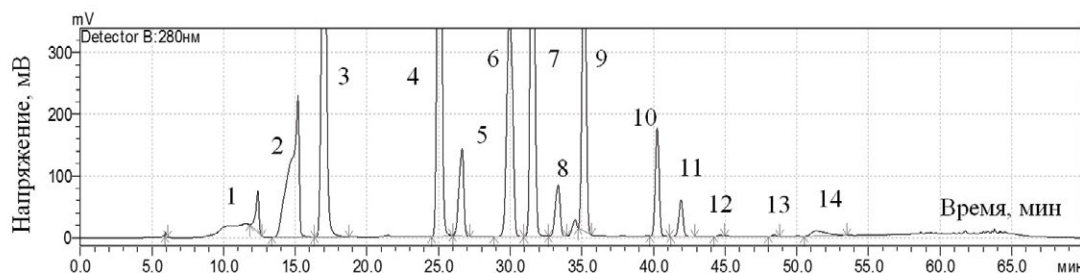


Рис. 1. Хроматограмма анализа смеси фенольных и фурановых соединений: 1 – галловая кислота, 2 – 5-гидроксиметилфурфурол, 3 – фурфурол, 4 – 4-гидроксibenзальдегид, 5 – ванилиновая кислота, 6 – 5-метилфурфурол, 7 – гваякол, 8 – сиреневая кислота, 9 – ванилин, 10 – сиреневый альдегид, 11 – п-кумаровая кислота, 12 – кониферилловый альдегид, 13 – синаповый альдегид, 14 – эллаговая кислота.

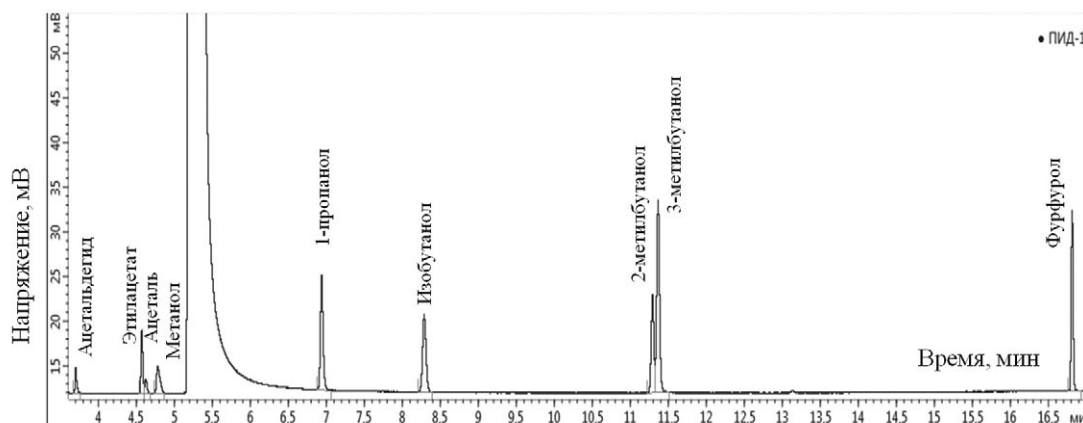


Рис. 2 - Хроматограмма анализа градуировочной смеси растворов летучих органических примесей (ацетальдегид, этилацетат, ацеталь, метанол, 1-пропанол, изобутанол, 2-метилбутанол, 3-метилбутанол, фурфурол).

Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук (тема №0529-2014-0106).

Литература:

1. Медриш М.Э., Абрамова И.М., Поляков В.А., Савельева В.Б., Гаврилова Д.А. Методика количественного определения фенольных и фурановых соединений в спиртных напитках // Пиво и напитки. -2017, №6, С.22-24.
2. Медриш М.Э., Абрамова И.М., Гаврилова Д.А., Павленко С.В. Методика количественного определения фенольных и фурановых соединений в спиртных напитках // Пиво и напитки. -2017, №6, С.22-24.
3. Гарькуша М.В., Положишникова М.А. Роль ароматических компонентов виски в решении задач идентификационной экспертизы// М.: «Панорама», «Товаровед продовольственных товаров», №1, 2015.

UDK 663.5

CONTROL OF AUTHENTICITY AND QUALITY OF ALCOHOLIC BEVERAGES ON THE BASIS OF AGED GRAIN DISTILLATES

Abramova I.M., Medrish M.E., Savelyeva V.B., Matrosova N.V., Pavlenko S.V.

*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: medrishm@mail.ru*

It has been developed methods for determining volatile organic impurities, phenolic and furan compounds in alcoholic beverages based on grain distillates using gas chromatography and high-performance liquid chromatography methods.

Key words: alcoholic beverages, grain distillates, volatile organic impurities, phenolic compounds, furan compounds, gas chromatography, high performance liquid chromatography

Currently, alcoholic beverages obtained from grain distillates are becoming increasingly popular among the population. The quality of these drinks depends on various factors: raw materials, technology, aging. At all stages of the technological process of the production of grain distillates and beverages on their basis, volatile and nonvolatile organic impurities are formed, which participate in the formation of the organoleptic properties of beverages.

Volatile components (fusel oils, aldehydes, ethers) of grain distillates and alcoholic beverages based on them have a greater effect on product quality, forming their taste and aroma. In this case, volatile impurities can pass into the distillate during distillation as well as form during the aging process.

Nonvolatile components (phenolic and furanic compounds) in alcoholic beverages based on aged grain distillates are formed during the storage of the product in contact with oak wood and are one of the main markers that allow detecting falsified products. During aging, reactions occur as a result of which new flavors are formed, and vice versa, other chemical compounds are removed.

One of the main tasks in the production of alcoholic beverages is to increase their level of quality and fight against fraud.

The most advanced methods to optimize the procedure for quality control of alcoholic beverages are high-performance liquid and gas chromatography methods. Therefore, the development of methods for the determination of volatile and non-volatile organic impurities is a priority task for controlling the authenticity and quality of alcoholic beverages based on aged grain distillates.

Non-volatile impurities that make the greatest contribution to the organoleptic and physico-chemical qualities of alcoholic beverages under selected conditions can be determined simultaneously by an express method for determining the content of phenolic and furan compounds. This method allows you to set the aging time of grain distillates, as well as the causes of sedimentation, and to ensure the possibility of identifying fake alcoholic beverages.

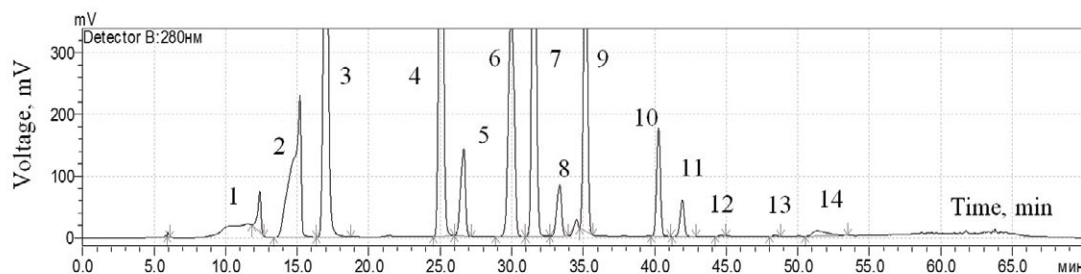


Fig. 1. Chromatogram of analysis of a mixture of phenolic and furan compounds: 1 -gallic acid, 2 - 5-hydroxymethylfurfural, 3 - furfural, 4 - 4-hydroxybenzaldehyde, 5 - vanillic acid, 6 - 5-methylfurfural, 7 - guaiacol, 8 - syringic acid, 9 - vanillin, 10 - lilac aldehyde, 11 - p-coumaric acid, 12 - coniferyl aldehyde, 13 - sinapaldehyde, 14 - ellagic acid.

The method of determining volatile organic impurities (acetaldehyde, ethyl acetate, acetal, methanol, 1-propanol, isobutanol, 2-methylbutanol, 3-methylbutanol, furfural) allows determining the amount and ratio of

volatile components to establish the quality and authenticity of this type of product.

From the literature it is known that by the ratio of 2-methylbutanol to 3-methylbutanol it is possible to identify whiskey in order to detect counterfeit products. As a result of the studies, optimal conditions for the separation of isoamyl alcohol into isomers were selected using the method of gas chromatography.

The studies were carried out at the expense of subsidies for the fulfillment of the state assignment within the framework of the Program for Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences (subject # 0529-2014-0106).

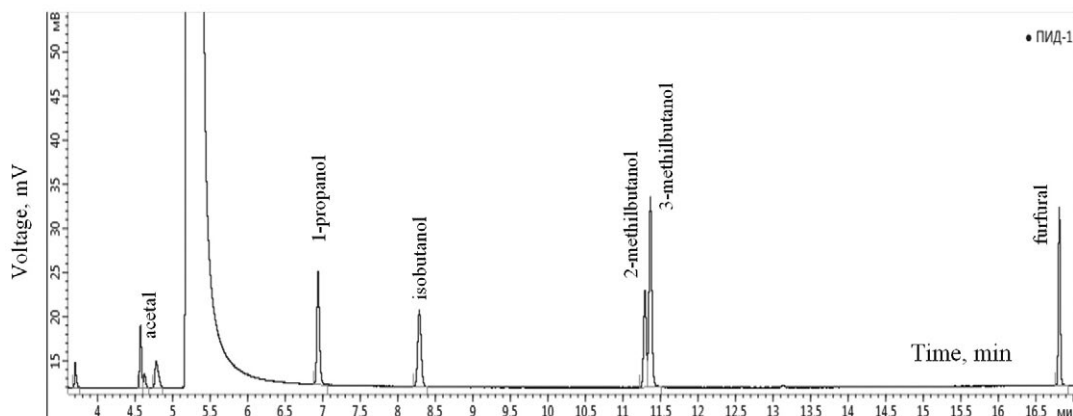


Fig. 2. Chromatogram of the analysis of a calibration mixture of solutions of volatile organic compounds (acetaldehyde, ethyl acetate, acetal, methanol, 1-propanol, isobutanol, 2-methylbutanol, 3-methylbutanol, furfural).

References:

1. Medrish M.E., Abramova I.M., Polyakov V.A., Savelyeva V.B., Gavrilova D.A. Technique of quantitative determination of phenolic and furan compounds in alcoholic beverages // *Beer and beverages* – 2017. - №6. - p.22-24.
2. Medrish M.E., Abramova I.M., Gavrilova D.A., Pavlenko S.V. Method for the quantitative determination of phenolic and furan compounds in alcoholic beverages // *Beer and beverages*. -2017. - №6. - p.22-24.
3. Garkusha M.V., Polozhishnikova M.A. The role of the aromatic components of whiskey in solving the problems of the identification expertise // *M.: Panorama, Food Products Merchant*. - No. 1. - 2015.

УДК: 663/664 (043.2)

МИКРОБНАЯ ПРОТЕИНИЗАЦИЯ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО СЫРЬЯ: РЕАЛЬНОСТЬ И ВОЗМОЖНОСТИ.

Борисенко Е.Г., Родригес Веласкес Индра, Пироговская Е.К., Маслова Т.А., Азанова А.А.

Московский Государственный университет пищевых производств,
Москва, Россия, 125080, Волоколамское шоссе, 11
e-mail: biotech@mgup.ru

Разработаны принципы протеинизации агропромышленного сырья с помощью аналога рубца дигастричных животных, сконструированного из дрожжей и бактерий, выделенных из съедобных материалов и активно осуществляющих биоконверсию этих материалов в растительно-микробные субстанции, а из них в пищевые и кормовые продукты.

Ключевые слова: дефицит белка, рубец, микробная биоконверсия, дрожжи, функциональные продукты

ФАО и ВОЗ на рубеже тысячелетий определили дефицит белка на планете в 60-65 млн т/год (20 млн т в пище и 40-45 млн т в кормах). Белок одноклеточных очень перспективен для ликвидации этого дефицита. Его широкое использование для конструирования пищи – самый реальный процесс в ее производстве в ближайшем будущем.

Отечественная биотехнология уже производила высокоценный по аминокислотному составу дрожжевой кормовой белок на гидролизатах целлюлозы и парафинах нефти в количестве до 1.6 млн т/год.

С 90-х годов Московский Государственный университет пищевых производств (МГУПП) занимается созданием дрожжевых функциональных продуктов для человека и животных на базе негидролизованно-

го твердого растительного сырья путем его прямой биоконверсии дрожжами [1-5].

В результате многолетних исследований сотрудниками кафедры биотехнология интенсифицировано производство белка на принципах функционирования рубца дигастричных животных, где микроорганизмы культивируют на целлюлозных субстратах.

Созданы микробиоценозы искусственного рубца на основе дрожжей рода *Pichia*, выделенных из разных съедобных субстратов (женского и коровьего молока, разных видов зерна, трав, сена и т.п.), обладающих значительной целлюлазной активностью, и лактобактерий, хорошо ассоциирующихся с этими дрожжами.

В качестве субстанций для биоконверсии предложено использовать измельченные целлюлозосодержащие субстраты (пророщенное зерно, зерновые отруби, травяная, сенная, соломенная мука и т.п.). На жидких 6-8 %-ных отварах этих субстратов дрожжи рода *Pichia* накапливают биомассу практически как на коммерческих средах для дрожжей $(2-3) \times 10^9$ клеток/мл, на твердых увлажненных субстратах - до 10^{10} клеток/г. Посев пробиотических лактобактерий на жидкие и твердые дрожжерастительные субстраты позволяет получать комплексные культуры с содержанием бактерий до $10^{11}-10^{12}$ клеток/г. Содержание белка в конечном продукте увеличивается на 25-30%.

Осуществлена биоконверсия растительного сырья в условиях глубинно-твердофазного культивирования. Кормовые дрожжи на пилотных линиях выращиваются нашими выпускниками во Вьетнаме.

Созданы рецептуры пищевых продуктов на базе микробно-растительных ферментированных субстанций с введением дополнительных ингредиентов. Производство сухих завтраков, хлеба, йогуртов осуществлено нами в условиях МГУПП.

Анализ перспектив переработки 3,2 млрд т российского растительного сырья/год предлагаемым способом показывает возможность производства 60-65 млн т/год белка (120-130 млрд \$). Потребности страны максимум 10-15 млн т/год. Потенциальный экспорт ~50 млн т/год (~100 млрд \$).

Создание организационной структуры с участием биотехнологической науки и российского бизнеса для быстрого масштабирования полученных результатов совершенно реально. Эта работа не исключает международное сотрудничество с партнерами, уже идущими по этому пути (например, с тем же Вьетнамом при его согласии).

Литература:

1. Нгуен Тхи Тхань Ха. Разработка технологии дрожжевых ферментированных продуктов на основе рисовой муки: Автореф. дис.канд.техн.наук. – М., 1996. – 24 с.
2. Нгуен Ким Зунг. Разработка технологии получения дрожжевых лечебно-профилактических препаратов на твердых растительных субстратах: Автореф. дис.канд.техн.наук. – М., 1996. – 24 с.
3. Горин К. В. Разработка технологии получения микробных нутриентов – биокорректоров на базе целлюлозосодержащего сырья: Автореф. дис.канд.техн.наук. – М., 2011. – 25 с.
4. Нгуен Чыонг Занг. Разработка технологии продуктов питания на базе микробной биоконверсии комплексного растительного сырья: Автореф. дис.канд.техн.наук. – М., 2012. – 25 с.
5. Чан Ван Ти. Разработка технологии дрожже-бактериальных функциональных продуктов на базе зернового сырья: Автореф.дис.канд.техн.наук. – М., 2013. – 25 с.

UDC: 663/664 (043.2)

MICROBIAL PROTEINIZATION OF AGRICULTURAL RAW MATERIALS: OPPORTUNITIES AND REALITY

Borisenko EG, Rodriguez Velazquez Indra, Pirogovskaya EK, Maslova TA, Azanova AA.

Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia, 125080, Volokolamskoye Highway 11
e-mail: biotech@mgupp.ru

Principles of proteinization of agro-industrial raw materials were developed using an analogue of rumen of digastric animals, constructed from yeast and bacteria, isolated from edible materials and actively performing bioconversion of these materials into plant-microbial substances, and from them into food and feed products.

Key words: protein deficiency, rumen, microbial bioconversion, yeast, functional products

FAO and WHO at the turn of the millennium identified a protein deficit on the planet at 60-65 million tons / year (20 million tons in food and 40-45 million tons in feed). Protein of unicellular microorganisms is more promising

to eliminate this deficiency. Its wide use for designing food is the most realistic process in food production in the near future.

Domestic biotechnology produced yeast feed protein, high in amino acid composition, on cellulose hydrolyzates and oil paraffins in the amount of up to 1.6 million tons / year.

Since the 1990s, Moscow State University of Food Production (MGUPP) has been developing yeast-based functional products for humans and animals based on non-hydrolyzed solid plant raw materials through direct bioconversion by yeast [1–5].

As a result of many years of research by the staff of the Department of biotechnology intensified protein production on the principles of the functioning of the rumen of digastric animals, where microorganisms grow primarily on cellulosic substrates.

To create microbiocenoses of artificial scar based on the yeast of the genus *Pichia*, isolated from different edible substrates (female and cow's milk, different types of grain, herbs, hay, etc.) with significant cellulase activity, and lactobacilli that are well associated with these yeasts.

As substances for bioconversion to use crushed cellulose-containing substrates (germinated grain, grain bran, herbal, hay, straw flour, etc.). The yeast of the genus *Pichia* accumulates biomass on liquid 6-8% broths of these substrates practically as on commercial media for yeast ($2-3 \times 10^9$ cells /ml, on solid moist substrates up to 10^{10} cells /g. Seeding probiotic lactobacilli on liquid and solid yeast-plant substrates allows to obtain complex cultures with bacteria content up to 10^{11} - 10^{12} cells /g. the protein content in the final product is increased by 25-30%.

Bioconversion of plant materials is carried out in the conditions of deep-phase/solid-state cultivation. Feed yeast on pilot lines are growing by our graduates in Vietnam.

Recipes of food products on the basis of microbial and vegetable fermented substances with the introduction of additional ingredients. Production of breakfast cereals, bread, yoghurt was made by us in the MGUPP.

Analysis of the prospects for processing 3.2 billion tons of Russian plant raw materials/year for the proposed system shows the possibility of producing 60-65 million tons/year of protein (\$ 120-130 billion). The country's needs are a maximum of 10-15 million tons/year. Potential export ~ 50 million tons/year (~ \$ 100 billion).

Creating an organizational structure involving biotech science and Russian business to quick scale the results obtained is quite real. This work does not preclude international cooperation with partners already pursuing this path (for example, with the same Vietnam, with its consent).

References:

1. Nguen Thi Thanh Ha. Technology development of fermented yeast products based on rice flour: Abstract of Candidate of Engineering Sciences. - M., 1996. - 24 p.
2. Nguen Kim Dung. Development of technologies for the production of yeast therapeutic and prophylactic drugs based on plant substrates: Abstract of Candidate of Engineering Sciences. - M., 1996. - 24 p.
3. Gorin KV. Development of technologies for the production of microbial nutrients - biocorrectors based on cellulose-containing raw materials: Abstract of Candidate of Engineering Sciences. - M., 2011. - 25 p.
4. Nguen Truong Giang. Development of food technologies based on microbial bioconversion of complex plant materials: Abstract of Candidate of Engineering Sciences. - M., 2012. - 25 p.
5. Tran Van Chi. Development of technologies for yeast-bacterial functional products based on grain raw materials: Abstract of Candidate of Engineering Sciences. - M., 2013. - 25 p.

УДК 664.2:557.15

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПОРИСТЫЙ КУКУРУЗНЫЙ КРАХМАЛ: ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Папахин А.А., Бородин З.М.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопроductов», Россия, 140051, Московская обл., Люберецкий р-н, п. Красково, ул. Некрасова д. 11, тел.:
e-mail: vniik@arrisp.ru

Получены опытные образцы ферментативно модифицированного пористого кукурузного крахмала путем низкотемпературного биокатализа нативного крахмала. Показано, что в зависимости от степени гидролиза нативного крахмала в присутствии глюкоамилазы сохранялась форма гранул, но изменялся его состав и физико-химические свойства, что свидетельствовало о его модификации.

Ключевые слова: нативный крахмал, модифицированный пористый крахмал, амилолитические ферменты, низкотемпературный гидролиз

На основании результатов проведенных исследований по изучению действия амилолитических ферментов на гранулы крахмала в неклестеризованном состоянии разработан новый способ модификации крахмала путем низкотемпературного гидролиза с применением амилолитических ферментов (патент РФ № 2528004); получены опытные образцы модифицированного пористого кукурузного крахмала. Целью данной работы являлось определение основных физико-химических и функциональных свойств ферментативно модифицированного пористого крахмала с установлением оптимальной степени гидролиза крахмала. Установлено, что белок и зола в процессе низкотемпературного гидролиза оставались в составе негидролизованного крахмала, их содержание, в % на СВ, увеличивалось в 1,5-2 раза. Содержание амилозы в крахмале в начальной стадии процесса гидролиза резко увеличивалось (с 21,64 до 25,54 %), затем снижалось, и оставалось, практически, постоянным, близким к нативному крахмалу (21,5%). В процессе гидролиза повышалась водосвязующая способность, но снижалась растворимость пористого крахмала, прозрачность клейстера и устойчивость к замораживанию-оттаиванию. При гидролизе крахмала до степени гидролиза СГК = 52% повышалась адсорбционная способность пористого крахмала и набухаемость. Увеличение СГК выше 52% приводило к значительному снижению указанных выше свойств крахмала. Ферментативная атакуемость образцов пористого крахмала амилазами в клейстеризованном состоянии находилась на уровне исходного крахмала, а в нативном – значительно его превышала, что свидетельствовало о пониженной резистентности модифицированного пористого крахмала, по сравнению с нативным кукурузным крахмалом. В рамках разработанной технологии предлагается проводить процесс гидролиза до СГК = $50 \pm 2\%$, с однократным промыванием осадка пористого крахмала при разделении реакционной смеси с гидромодулем 1:4.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых МК-5651.2018.11.

UDC 664.2:557.15

MODIFIED POROUS CORN STARCH: OBTAINING AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

Papakhin A.A., Borodina Z.M.

*All-Russian Research Institute for starch products - branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
11 Nekrasova St., Kraskovo, Moscow region, 140051, Russia
e-mail: vnijk@arrisp.ru*

Experimental samples of enzymatically modified porous corn starch were obtained by low-temperature biocatalysis of native corn starch. It was shown, that depending on the degree of hydrolysis of native starch in the presence of glucoamylase, the shape of the granules is retained, but composition and physicochemical properties of starch change, which indicates its modification.

Key words: native, modified porous starch, amylolytic enzymes, low-temperature hydrolysis

Based on the results of studies on the effect of amylolytic enzymes on starch granules in a non-gelatinized state, a new method of starch modification by low-temperature hydrolysis using amylolytic enzymes (RF Patent No. 2528004) was developed and experimental samples of modified porous corn starch were obtained. The aim of this work was determination of the basic physico-chemical and functional properties of enzymatically modified porous starch with the establishment of the optimal degree of hydrolysis of native starch. It is established that protein and ash in the process of low-temperature hydrolysis remain in the structure of non-hydrolyzed starch, their content in % by DM increases by 1.5-2 times. The content of amylose in starch in the initial stage of the hydrolysis process increases sharply (from 21.64 to 25.54 %), then decreases, and remains almost constant, close to the native starch (21.5%). During hydrolysis the water-binding capacity is increased, but reduces the solubility of the porous starch and the transparency of the gel, as well as resistance to freezing-thawing. When hydrolysis of starch to a degree of hydrolysis of 52% increases the adsorption capacity of porous starch and swelling, an increase above 52% leads to a significant decrease in these important properties of starch. Enzymatic susceptibility of the samples of porous starch by amylases in the gelatinized state is at the level of the initial starch, and in the native one – significantly exceeds it, which indicates a reduced resistance of the modified porous starch in comparison with the native corn

starch. The most optimal for the developed technology is proposed to carry out the hydrolysis process to SGK = 50±2 % with a single washing of the porous starch precipitate when separating the reaction mixture with the hydromodule 1:4.

The research was supported by the grant of the President of the Russian Federation for young scientists МК-5651.2018.11.

УДК 637.144.5

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА МОЛОЗИВА

Асафов В.А.¹, Харитонов В.Д.¹, Танькова Н.Л.¹, Курченко В.П.², Головач Т.Н.².

¹Федеральное государственное автономное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия
115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д.35, корп. 7
e-mail: gnu-vnimi@yandex.ru

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
220030, г. Минск, пр. Независимости 4
e-mail: kurchenko@tut.by

Выявлены основные закономерности изменения микробиологических показателей молозива после его обезжиривания, ферментации, замораживания, сублимационной сушки и темперирования.

Ключевые слова: Молозиво, функциональный продукт, микробиологические показатели, сублимационная сушка, замораживание.

К перспективному направлению получения молочных и пищевых функциональных продуктов относится использование в их составе молозива и его биологически-активных компонентов. Ввиду своего уникального состава в природных условиях молозиво обеспечивает иммунную защиту телёнка в первые часы жизни и способствует созданию у него собственной иммунной системы, а так же выполняет целый ряд других функций, обеспечивающих полноценное развитие новорожденного организма.

В настоящее время проводятся многочисленные исследования и разрабатываются способы по использованию молозива и его компонентов в виде самостоятельных биологически-активных или обогащенных добавок в функциональных продуктах.

Учитывая то, что в нашей стране промышленная переработка молозива до сих пор не освоена, в данной работе рассмотрены некоторые вопросы снижения бактериального уровня молозива в процессе основных этапов его переработки.

В ходе исследований, в частности, были рассмотрены вопросы сравнительного изменения микробиологических показателей получаемого молозива после его обезжиривания центробежным способом, ферментации консорциумом культур, замораживания, сублимационной сушки и последующим темперированием после высушивания.

Исследования проведенные по этим направлениям показали, что наилучшие результаты были достигнуты с использованием биоконсервации (сублимационной сушки) и последующего темперирования молозива, а так же сочетания замораживания молозива, хранения длительностью до 0,5 года и последующего его сквашивания после дефростации. При этом обеспечивалось получение образцов с инактивированной болезнетворной микрофлорой.

UDC 637.144.5

SOME ASPECTS OF COLOSTRUM MICROBIOLOGICAL COMPOSITION REGULATION

Asafov V.A.¹, Khartitonov V.D.¹, Tankova N.L.¹, Kurchenko V.P.², Golovatch T.N.²

¹ The Federal State Individual Dairy Institute, Moscow, Russia
115093, Moscow, Lusinovskaya, 35, Bld. 7
e-mail: gnu-vnimi@yandex.ru

² Belorussian State University, Minsk, Belorussia Republik
220030, Minsk, pr. Nezavisimosti 4
e-mail: kurchenko&tut.by

The basic rules of colostrum biological index after its defatting, fermentation, freezing, freeze-drying and tempering have been revealed.

Key words: colostrum, functional product, microbiological index, freeze-drying, freezing

The development of the dairy and food functional products on the basis of colostrum and its biologically active components is very perspective field. Due to its unique composition in the natural conditions colostrum provides for calf immune protection in the first hours of life and promotes the creation of its own immune system as well as performs a lot of other functions ensuring the relevant growth of the new born organism.

Nowadays a lot of investigations are carried out and the methods of utilization of colostrum and its components as independent biologically active or fortified additives in the functional products are being developed.

Considering that in our country the industrial processing of colostrum has not been developed the present work covers some problems dealing with reduction of colostrum bacterial level in the process of the main stages of its processing.

Particularly in the process of the investigation the problems of the comparative modification of the obtained colostrum microbial index after its defatting by the centrifugal method, fermentation by the culture consortium, freezing, freeze-drying and the following tempering after drying have been considered.

The studies carried out in these directions showed that the best results were obtained by using of bioconservation (freeze-drying) and the following colostrum tempering as well as the combination of colostrum freezing, long storage up to 0,5 year and its following fermentation after deflostation. At that the obtaining of the samples with inactivated pathogenic microflora was provided.

УДК 663.15

МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ – ПРОДУЦЕНТЫ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ

Серых И.Н.¹, Николаев Ю.А.², Эль-Регистан Г.И.², Шаненко Е.Ф.¹, Ганина В.И.¹

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», РФ, 125080, г. Москва, Волоколамское ш., 11
e-mail: i.serykh@protonmail.com

²ФИЦ Биотехнологии РАН, РФ, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Способность к биосинтезу нейромедиаторов была показана у 16 штаммов молочнокислых микроорганизмов, принадлежащим к родам *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*. Наиболее активные штаммы были использованы для создания функциональных напитков.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, нейромедиаторы, кисломолочные функциональные напитки

В конце 20 века появились данные о способности микроорганизмов синтезировать нейроактивные соединения серотонин, дофамин, норадреналин и другие. Способность к синтезу серотонина обнаружена у *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* и других микроорганизмов (Олескин с соавт., 2016). С развитием методов препаративного выделения и идентификации низкомолекулярных соединений количество исследований по микробному синтезу нейромедиаторов увеличилось (Жиленкова с соавт., 2013). Получены данные о способности микроорганизмов, в том числе и молочнокислых, синтезировать катехоламины, нейротропные аминокислоты и другие нейроактивные соединения (Олескин с соавт., 2014).

Микробные катехоламины –норадреналин и дофамин были идентифицированы в биомассе многих про- и эукариотов, в т.ч. *E. coli*, *S. cerevisiae* и бактерии рода *Lactobacillus*.

Показано, что лакто- и бифидобактерии активно синтезируют нейротропные аминокислоты: таурин, глицин и β-аланин.

На основании этих данных выдвинуто предположение, что симбиотическая микробиота влияет не только на иммунный, но и на нервно-психический статус человека.

Предполагается что, нормализуя и оптимизируя состав нейромедиаторов с помощью пробиотиков можно профилировать развитие депрессии и других последствий стресса. Таким образом использование продуцентов нейромедиаторов может усилить профилактическое и терапевтическое действие ферментированных продуктов.

Целью нашей работы было выявление среди микроорганизмов заквасочных культур, используемых в пищевой промышленности, активных продуцентов биогенных аминов – норадреналина, дофамина, серотонина и др. Способность к биосинтезу нейромедиаторов была изучена у 16 штаммов молочнокислых микроорганизмов, принадлежащих к родам *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*.

Культивирование проводили на гидролизате молока. В культуральной жидкости, после отделения биомассы, определяли содержание биогенных аминов, а также их предшественников и продуктов окислительного распада. Количественное определение нейромедиаторов проводили методом ВЭЖХ. Биогенные амины и их предшественники разделяли на обращённо-фазовой колонке ReproSie-Pur с последующей амперометрической детекцией на стекло-угольном электроде.

Содержание нейроактивных аминокислот определяли на хроматографической установке LC-304T (США) с последующей флуориметрической детекцией.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что наиболее активным продуцентом катехоламинов среди исследованных штаммов являлся *Lactococcus lactis*, при культивировании которого содержание норадреналина в среде возрастало до 245 пикомолей/мл.

Высокое содержание этого нейромедиатора обнаруживалось в среде и при культивировании *Lactobacillus acidophilus* (229 пикомоль/мл)

Эти микроорганизмы были использованы для получения ферментированного напитка. Наилучшими физико-химическими и органолептическими показателями обладал ферментированный напиток, приготовленный из смеси яблочного и тыквенного соков с использованием в качестве заквасочной культуры *Lactococcus lactis*. Содержание живых клеток микроорганизмов в напитке составляло 1×10^8 КОЕ в 1 см³.

Литература:

1. Олескин А.В., Эль-Регистан Г.И., Шендеров Б.А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота-хозяин: роль нейромедиаторов // *Микробиология* 2016. Т.85. №1. С.3-25.
2. Жиленкова О.Г., Шендеров Б.А., Клодт П.М., Кудрин В.С., Олескин А.В. Молочные продукты как потенциальный источник соединений, модифицирующих поведение потребителей // *Молочная промышленность*. 2013. №10.
3. Олескин А.В., Жиленкова О.Г., Шендеров Б.А., Амерханова А.М., Кудрин В.С., Клодт П.М. Заквасочные культуры лактобацилл - продуценты нейромедиаторов: биогенных аминов и аминокислот // *Молочная промышленность*. 2014. № 9. С. 42-43.

UDC 663.15

DAIRY BACTERIA - PRODUCERS OF NEUROMEDIATORS

Serykh I.N.¹, Nikolaev Yu.A.², El-Registan G.I.², Shanenko E.F.¹, Ganina V.I.¹

¹Moscow State University of Food Production, Russian Federation, 125080, Moscow, Volokolamskoe shosse, 11
e-mail: i.serykh@protonmail.com

²FRC Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 119071, Moscow, Leninsky Prospekt, 33, Building 2

The ability to biosynthesis of neurotransmitters was shown in 16 strains of lactic acid microorganisms belonging to the genera *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*. The most active strains were used to create functional beverages.

Key words: lactic acid bacteria, neurotransmitters, fermented milk functional drinks

At the end of the 20th century, data appeared on the ability of microorganisms to synthesize neuroactive

compounds serotonin, dopamine, norepinephrine and others. The ability to synthesize serotonin was found in *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, and other microorganisms (Oleskin et al., 2016). With the development of methods for the preparative isolation and identification of low molecular weight compounds, the number of studies on the microbial synthesis of neurotransmitters has increased (Zhilenkova et al., 2013). Data were obtained on the ability of microorganisms, including lactic acids, to synthesize catecholamines, neurotropic amino acids and other neuroactive compounds (Oleskin et al., 2014).

Microbial catecholamines – norepinephrine and dopamine were identified in the biomass of many pro- and eukaryotes, including *E. coli*, *S. cerevisiae* and bacteria of the genus *Lactobacillus*.

Lacto- and bifidobacteria have been shown to actively synthesize neurotropic amino acids: taurine glycine and β -alanine.

The basis of this data suggests that the symbiotic microbiota affects not only the immune, but also the neuropsychological status of a person.

It is assumed that by normalizing and optimizing the composition of neurotransmitters with the help of probiotics, it is possible to prevent the development of depression and other effects of stress. Thus, the use of producers of neurotransmitters can enhance the prophylactic and therapeutic effect of fermented products.

The purpose of our work was to identify among the microorganisms starter cultures used in the food industry, the active producers of biogenic amines - norepinephrine, dopamine, serotonin, etc. The ability to neurotransmitter biosynthesis was studied in 16 strains of lactic acid microorganisms belonging to the genera *Lactococcus*, *Streptococcus*, *ecoprocus*.

Cultivation was carried out on milk hydrolyzate. In the culture fluid, after the separation of biomass, the content of biogenic amines, as well as their precursors and products of oxidative decomposition, was determined. Quantitative determination of neurotransmitters was performed by HPLC. Biogenic amines and their precursors were separated on a ReproSie-Pur reversed phase column, followed by amperometric detection on a glass-carbon electrode.

The content of neuroactive amino acids was determined on a chromatographic installation LC-304T (USA), followed by fluorimetric detection.

A comparative analysis of the obtained data showed that the most active producer of catecholamines among the studied strains was *Lactococcus lactis*, during cultivation of which the content of norepinephrine in the medium increased to 245 pmol / ml.

The high content of this neurotransmitter was found in the medium and during the cultivation of *Lactobacillus acidophilus* (229 pmol / ml)

These microorganisms were used to produce a fermented beverage. The best physico-chemical and organoleptic characteristics were provided by a fermented drink prepared from a mixture of apple and pumpkin juices using *Lactococcus lactis* as a starter culture. The content of living cells of microorganisms in the drink was 1×10^8 CFU in 1 cm³.

References.

1. Oleskin A.V., El-Registan G.I., Shenderov B.A. Intermicrobial chemical interactions and microbiota – host dialogue: the role of neurotransmitters // *Microbiology* 2016. T.85. №1. P.3-25.
2. Zhilenkova O.G., Shenderov B.A., Klodt P.M., Kudrin V.S., Oleskin A.V. Dairy products as a potential source of compounds that modify the behavior of consumers // *Dairy industry*. 2013. № 10.
3. Oleskin A.V., Zhilenkova O.G., Shenderov B.A., Amerkhanova A.M., Kudrin V.S., Klodt P.M. *Lactobacillus* starter cultures - producers of neurotransmitters: biogenic amines and amino acids // *Dairy industry*. 2014. No. 9. P. 42-43.

УДК 664.38: 644.53

МУЛЬКОМПОНЕНТНЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ СО СБАЛАНСИРОВАННЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ

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; irina_ivahnenko@bk.ru

В работе представлены теоретические и практические основы формирования новых мультикомпонентных

белковых композиций из различных видов растительного сырья с использованием фермента трансглутаминазы с целью улучшения биологической ценности и функционально-технологических свойств продуктов.

Ключевые слова: белковые композиции, белковые препараты, аминокислотный скор, биологическая ценность

Одной из глобальных проблем для населения Земного шара является дефицит полноценного белка, который оценивается в 10-25млн. т в год. На одного жителя планеты приходится около 60 г белка в сутки, при норме 70 г. Около половина населения планеты страдает от недостатка белка, что является не только экономической, но и социальной проблемой современного мира [1]. Решение проблемы с использованием полноценного растительного белка как наиболее легко возобновляемого, в отличие от белка животного происхождения, перспективно и реально. Растительный рацион, содержащий полноценный белок в необходимом количестве, можно обеспечить на основе использования пищевых ингредиентов, полученных из различных белоксодержащих источников. Наиболее распространенным и доступным белком злаковых культур является сухая пшеничная клейковина (СПК), которая, как и другие культуры, дефицитна по лизину - одной из важнейших незаменимых аминокислот в питании человека. В то же время высокое количество этой аминокислоты содержат бобовые, пасленовые, псевдозлаковые, с другой стороны, белки злаков способны дополнять белки зернобобовых и пасленовых дефицитной аминокислотой метионин [2]. Более того, с технологической точки зрения, добавление белков из различного сырья к СПК и возможность сшивания белков с высоким содержанием групп лизина ферментом трансглутаминазой, повышает реактивность белков и способность выполнять ими технологические функции [3]. Формирование новых мультикомпонентных полимеров может расширить использование СПК и в других областях, наряду с хлебопечением, обеспечивая поступление в организм полноценного белка.

На базе метода расчета «Монте-Карло» нами разработана программа, позволяющая в автоматическом режиме производить качественный и количественный подбор белковых компонентов из различных источников растительного белка с балансировкой композитов по аминокислотному составу. Программа обеспечивает расчеты для композиций, содержащих в своем составе от 2 до 8 различных растительных белков. Ранее в соответствии с этой программой нами разработаны белковые композиты на основе СПК и амарантового белка [4], смесей периферических частей зерна пшеницы, ржи, ячменя (крупка, отруби, шелуха), гороховой муки, нута, продуктов переработки зерна тритикале на крахмал с хорошими функциональными свойствами и аминокислотным составом [5]. Композиты обогащены всеми тремя лимитирующими аминокислотами: лизином, треонином, серосодержащими аминокислотами. На данном этапе с использованием фермента трансглутаминазы получены биокомпозиты следующего состава: СПК-гороховый белок, СПК-картофельный белок, картофельный белок-овсяный белок. Экспериментальным путем определены оптимальные параметры протекания реакции: гидромодуль, время экспозиции, концентрация ферментного препарата, функционально-технологические свойства.

Литература:

1. Донченко Л.В. *Технология функциональных продуктов питания: учеб. для вузов.* – 2-е изд. – М.: Юрайт, 2018. – С.101-102
2. Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N and Khan MS, *Nutritional quality of important food legumes.* Food Chem, 97:331-335 (2006).
3. Marco C, Rosell CM. *Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads.* Eur Food Res Technol. 2008;227:1205–1213.doi: 10.1007/s00217-008-0838-6.
4. Kolpakova V.V., Gaivoronskaya I.S., Gulakova V.A., Sardzhveladze A. S., *Composition on the basis of plant based proteins with the use of transglutaminase // International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM(Bulgaria, Albena, 2018)* – pp.119-126
5. 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.

UDC 664.38: 644.53

MULTI-COMPONENT PROTEIN COMPOSITIONS BASED ON PLANT PROTEINS WITH BALANCED AMINO ACID COMPOSITION

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. Gorbato, RAS, Kraskovo, Russia.

140051, Moscow region, Lubertsy district, Kraskovo, Nekrasova street, 11

e-mail: val-kolpakova@rambler.ru; irina_ivahnenko@bk.ru

In this data presented theoretical and practical bases formations of new multicomponent protein compositions from various types of plant based materials with using the transglutaminase enzyme in order to improve the biological value and functional and technological properties of products.

Key words: protein compositions, protein preparations, amino acid score, biological value

One of the global problems of the world's population is a deficit of high-grade protein, which is estimated at 10-25mln. t per year. About 60 g of protein per day per person on the planet, at a rate of 70 g. About half of the world's population suffers from a lack of protein, which is not only an economic, but also a social problem of the modern world [1]. Solving the problem with the use of high-grade vegetable protein as the most easily renewable, unlike animal protein, perspective and realistic. A vegetable diet containing high-grade protein in the required amount can be provided based on the use of food ingredients obtained from various protein-containing sources. The most common and affordable protein from cereal crops is dry wheat gluten (DWG), which, like other crops, is deficient in lysine - one of the most important essential amino acids in human nutrition. At the same time, a high amount of this amino acid contains legumes, solanaceous, pseudo-cereal, on the other hand, cereal proteins are able to supplement leguminous and solanaceous proteins with the deficient amino acid methionine [2]. Moreover, from a technological point of view, the addition of proteins from various raw materials to DWG and the possibility of crosslinking proteins with a high content of lysine groups by the transglutaminase enzyme, increases the reactivity of proteins and their ability to perform technological functions [3]. The formation of new multicomponent polymers can expand the use of DWG in other areas, along with bread making, providing intake of high-grade protein into the body.

On the base of the "Monte-Carlo" calculation method, we have developed a program that allows automatically make a qualitative and quantitative selection of protein components from various sources of vegetable protein with balancing composites according to their amino acid composition. The program provides calculations for compositions containing from 2 to 8 different vegetable proteins. Earlier, in accordance with this program, we developed protein composites based on DWG and amaranth protein [4], mixtures of peripheral parts of wheat grain, rye, barley (grains, bran, husks), pea flour, chickpea, products of triticale starch processing with good functional properties and amino acid composition [5]. Composites are enriched with all three limiting amino acids: lysine, threonine, sulfur-containing amino acids. At this stage, using the enzyme transglutaminase, were obtained biocomposites of the following composition: DWG – pea protein, DWG – potato protein, potato protein – oat protein. Experimentally was determined optimal parameters of the reaction: hydromodule, the exposure time, concentration of the enzyme preparation, functional and technological properties.

References:

1. Donchenko L.V. *Technology of functional food products: textbook for high schools*. – 2nd edition. – Moscow: Jurait, 2018. – pp.101-102
2. Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N and Khan MS, *Nutritional quality of important food legumes*. *Food Chem*, 97:331-335 (2006).
3. Marco C, Rosell CM. *Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads*. *Eur Food Res Technol*. 2008;227:1205–1213.doi: 10.1007/s00217-008-0838-6.
4. Kolpakova V.V., Gaivoronskaya I.S., Gulakova V.A., Sardzhveladze A. S., *Composition on the basis of plant based proteins with the use of transglutaminase* // *International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM*(Bulgaria, Albena, 2018) – pp.119-126
5. 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 663.52

О ПРИМЕНЕНИИ АНТИБИОТИКОВ В СПИРТОВОМ ПРОИЗВОДСТВЕ И МЕТОДАХ ИХ КОНТРОЛЯ В ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

Туршатов М.В., Соловьев А.О., Леденев В.П., Кривченко В.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

Проведен анализ посторонней микрофлоры спиртового производства и основные способы борьбы с ней, в том числе использование антибиотиков. Проанализированы основные методы контроля за содержанием антибиотиков и возможность их адаптации для анализа послеспиртовой барды.

Ключевые слова: посторонняя микрофлора, антибиотики, послеспиртовая барда, антибиотикорезистентность, методы контроля

При переработке углеводного сырья на спирт в полупродуктах производства неизбежно развивается посторонняя микрофлора, которая представлена молочнокислыми, уксуснокислыми, маслянокислыми, гнилостными бактериями и дикими дрожжами. Их развитие приводит к подавлению спиртовых дрожжей, снижению выхода и качества спирта. Технология производства спирта предусматривает регулярное проведение мероприятий[1], обеспечивающих микробиологическую чистоту процессов. В последние годы для подавления развития инфицирующей микрофлоры на предприятиях активно используются антибиотические средства. Основными из них являются препараты на основе пенициллина и вирджиниамицина: «Фриконт», «Септрал», «Нобак», «Вектор», «Лактрал» и др. Их дозировки на 1 м³ среды составляют от 0,5 до 2 г и более. Обычно их вносят в осахаренное сусло перед началом брожения или дрожжегенерации. Зрелая бражка поступает в бражную колонну, где от нее отделяется спирт и легколетучие компоненты, а жидкий остаток – послеспиртовая барда идет на переработку в сухие кормопродукты, а также могут применяться в качестве пищевой добавки – источника клетчатки, обогащенной аминокислотами, витаминами и микроэлементами[2]. При этом антибиотики, введенные в полупродукты основного спиртового производства, могут переходить в барду и далее в товарные продукты, пищевого и кормового назначения. Исследования показывают, что прием в пищу продуктов, содержащих антибиотики, приводит к антибиотикорезистентности патогенных штаммов микроорганизмов[3]. При этом снижается иммунитет организма, увеличивается его восприимчивость к различным заболеваниям. В настоящее время контроль за содержанием антибиотиков в продуктах переработки барды не осуществляется. В сложившейся ситуации целесообразно провести исследования по разработке методики контроля антибиотических средств в полупродуктах спиртового производства (осахаренное сусло, зрелая бражка, послеспиртовая барда) и получаемых кормопродуктах (сухая барда, кормовые дрожжи). Проведен анализ применяемых в настоящее время методик [4,5] контроля за содержанием антибактериальных препаратов в различных продуктах. Это микробиологический метод на основе тест-культур, иммуноферментный анализ, а также масс-спектрометрические методы. Их анализ показал, что применительно к барде в наибольшей степени подходит иммуноферментный анализ.

Научно-исследовательская работа по подготовке тезисов проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (№ 0529-2019-0066).

Литература:

1. Кононенко В.В., Туршатов М.В., Леденев В.П., Соловьев А.О., Кривченко В.А., Моисеева Н.Д., Базиков В.И. Эффективность применения озона для обеззараживания зерна в спиртовом производстве // Пиво и напитки. - 2017. - № 5. - С. 20-22.
2. Туршатов М.В., Моисеева Н.Д., Шлеленко Л.А. Использование сухой зерновой барды на пищевые цели // Ликероводочное производство и виноделие. - 2010. - № 7. - С. 18-19.
3. Горлов И.Ф., Сложенкина М.И., Харагургиева И.М., Аветисян З.Е. Проблема использования антибактериальных препаратов в животноводстве // В сборнике: Актуальные направления инновационного развития животноводства и современные технологии производства продуктов питания материалы международной научно-практической конференции. - 2016. - С. 270-273.

4. ГОСТ Р 53912–2010. Продукты пищевые. Экспресс метод определения антибиотиков. М.: Стандартинформ, 2011. 10 с.
5. МУК 4.1.3535-18 Определение остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов в продуктах животного происхождения. М., 2018. 226 с.

UDC 663.52

ABOUT THE USE OF ANTIBIOTICS IN ALCOHOL PRODUCTION AND THE METHODS OF THEIR CONTROL IN THE FINISHED PRODUCT

Turshatov M.V., Solovyov A.O., Ledenev V.P., Krivchenko V.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.
e-mail: lab78@mail.ru

The analysis of extraneous microflora of alcohol production and the main ways of combating it, including the use of antibiotics, have been carried out. The main methods for monitoring the content of antibiotics and the possibility of their adaptation for the analysis of distillery stillage are analyzed.

Key words: foreign microflora, antibiotics, distillery bard, antibiotic resistance, control methods

During the processing of carbohydrate raw materials into alcohol in the intermediate products, inevitably develops extraneous microflora, which is represented by lactic acid, acetic acid, butyric acid, putrefactive bacteria and wild yeast. Their development leads to the suppression of alcoholic yeast, reducing the yield and quality of alcohol. The technology of alcohol production provides for regular activities [1], ensuring the microbiological purity of the processes. In recent years, antibiotic agents have been actively used to suppress the development of the infecting microflora in enterprises. The main ones are drugs based on penicillin and virginiamycin: "Freekont", "Septrol", "Nobac", "Vector", "Lactrol", etc. Their dosages per m³ of the medium range from 0.5 to 2 g and more. Usually they are introduced into the saccharified mash before fermentation or yeast generation. Mature brew enters the brewing column, where alcohol and volatile components are separated from it, and the liquid residue - distillery bard goes for processing into dry feedstuffs, and can also be used as a food additive - a source of fiber, enriched with amino acids, vitamins and microelements [2]. At the same time, antibiotics introduced into the semi-products of the main alcohol production can be converted into bard and further into commercial products for food and feed purposes. Studies show that ingestion of products containing antibiotics leads to antibiotic resistance of pathogenic microorganism strains [3]. At the same time, the immunity of the organism decreases, its susceptibility to various diseases increases. Currently, there is no control over the content of antibiotics in bard products. In this situation, it is advisable to conduct research on the development of methods for monitoring antibiotic agents in alcohol production (saccharified mash, mature brew, distillery bard) and the resulting feed products (dry bard, fodder yeast). The analysis of currently used methods [4,5] for monitoring the content of antibacterial drugs in various products has been carried out. This is a microbiological method based on test cultures, linked immunosorbent assay, and mass spectrometric methods. Their analysis showed that, as applied to the bard, the enzyme immunoassay is most suitable.

The research work on the preparation of abstracts was carried out at the expense of subsidies for the state assignment under the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2013–2020 (No. 0529-2019-0066).

References:

1. Kononenko V.V., Turshatov M.V., Ledenev V.P., Solov'ev A.O., Krivchenko V.A., Moiseeva N.D., Bazikov V.I. *Effektivnost' primeneniya ozona dlya obezzarazhivaniya zerna v spirtovom proizvodstve // Pivo i napitki. - 2017. - № 5. - S. 20-22.*
2. Turshatov M.V., Moiseeva N.D., Shlelenko L.A. *Ispol'zovanie suhoj zernovoj bardy na pishchevye celi // Likerovodnochnoe proizvodstvo i vinodelie. - 2010. - № 7. - S. 18-19.*
3. Gorlov I.F., Slozhenkina M.I., Haragurgieva I.M., Avetisyan Z.E. *Problema ispol'zovaniya antibakterial'nyh preparatov v zhivotnovodstve // V sbornike: Aktual'nye napravleniya innovacionnogo razvitiya zhivotnovodstva i sovremennye tekhnologii proizvodstva produktov pitaniya materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii. - 2016. - S. 270-273.*
4. ГОСТ Р 53912–2010. Продукты пищевые. Экспрессметод определения антибиотиков. М.: Стандартинформ, 2011. 10 с.
5. МУК 4.1.3535-18 Определение остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов в продуктах животного происхождения. М., 2018. 226 с.

УДК 579.864:57.083

ОТХОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ КУКУРУЗЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Волкова Г.С., Куксова Е.В., Лакоза О.С., Серба Е.М.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, Москва, ул. Самокатная, 46,
e-mail: galina.volkova@bk.ru

Разработан способ ферментативной обработки кукурузной муки и созданы новые консорциумы бактериальных культур на основе селекционированных штаммов молочнокислых бактерий для создания технологии получения белковой кормовой добавки.

Ключевые слова: кукурузная мука, консорциум микроорганизмов, молочнокислые бактерии

Существующая острая потребность в кормовых добавках с пробиотическими свойствами и повышенным содержанием белка определяет актуальность новых разработок в области кормопроизводства [1] и биотехнологии. Коррекция рациона животных с помощью пробиотических кормовых добавок является одним из методов обеспечения адекватности кормов и позволяет не только обогащать их ценными компонентами, но и расширить возможности профилактики и лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта животных.

Объектом исследований являются производственные штаммы молочнокислых бактерий из коллекции ВНИИПБТ, в том числе: *Lactobacillus acidophilus* 1660/15, *L. plantarum* 578/26, *L. helveticus* R0052, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* Ac-103/12, культуральные жидкости монокультур и составленных консорциумов, кукурузная мука.

На основе совокупности экспериментальных данных по изучению процессов совместного культивирования молочнокислых бактерий и биосинтеза ими биологически активных метаболитов экспериментально обоснован состав трех высокоэффективных целевых консорциумов микроорганизмов для микробной конверсии кукурузной муки [2]. Биоконверсия ферментоллизатов кукурузной муки с помощью созданных консорциумов позволяет сократить процесс биосинтеза с 72 до 32-36 часов по сравнению с монокультурой.

Изучен спектр антимикробной активности культуральных жидкостей, консорциумов. Установлено содержание веществ, обладающих антимикробными свойствами в отношении микроорганизмов, вызывающих заболевания желудочно-кишечного тракта животных. В культуральной жидкости консорциумов обнаруживается до 12,4 мг/дм³ бактериоциноподобных веществ, что обуславливает антимикробные свойства получаемых кормовых добавок.

Разработан способ ферментативной обработки кукурузной муки на основе α -амилазы, позволяющий получать высокий выход биомассы. С помощью метода направленного культивирования микробной конверсии ферментолизата кукурузной муки консорциумами бактерий возможно получать кормовые добавки с одновременно высоким выходом биологически активных веществ и биомассы [3].

Разработаны оптимизированные питательные среды на основе кукурузной муки для культивирования новых консорциумов молочнокислых бактерий, установлены технологические параметры процесса биосинтеза целевых продуктов.

Исследование выполнено в рамках госзадания по теме № 0529-019-0066.

Литература:

1. Невитов М.Н. Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции // Пенза: РИО ПГСХА, - 2015. - 21с.
2. Лиховид П.В. Перспективы использования кукурузы сахарной в кормопроизводстве // Пути повышения орошаемого земледелия. - 2016. - №1 (61). - С.213-215.
3. Сон О.М. Использование отходов зерноперерабатывающей промышленности в микробиологическом синтезе кормового белка // Хранение и переработка сельхозсырья. - 2016. - №12. - С.24-27.

UDC 579.864:57.083

WASTE FROM THE PROCESSING OF CORN AS A BASIS FOR THE PRODUCTION OF PROTEIN FEED ADDITIVES WITH PROBIOTIC PROPERTIES

Volkova G.S., Kuksova E.V., Lakoza O.S., Serba E.M.

All-Russian research Institute of food biotechnology-branch of the Federal state budgetary institution of science of the Federal research center of food, biotechnology and food safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, 4B Samokatnaya str.,
e-mail: galina.volkova@bk.ru

A method of enzymatic processing of corn flour and created new consortia of bacterial cultures based on selected strains of lactic acid bacteria to create a technology for obtaining protein feed additives.

Key words: corn flour, consortium of microorganisms, lactic acid bacteria.

The existing acute need for feed additives with probiotic properties and high protein content determines the relevance of new developments in the field of feed production [1] and biotechnology. Correction of the diet of animals with the help of probiotic feed additives is one of the methods of ensuring the adequacy of feed and allows not only to enrich them with valuable components, but also to expand the possibilities of prevention and treatment of diseases of the gastrointestinal tract of animals.

The object of research is the production strains of lactic acid bacteria from the collection of VNIIPBT, including: *Lactobacillus acidophilus* 16605/15, *L. plantarum* 578/26, *L. helveticus* *Propionibacterium. shermanii* AC-103/12, cultural liquids composed of monocultures and consortia, corn flour.

On the basis of the set of experimental data on the study of the processes of joint cultivation of lactic acid bacteria and biosynthesis of their biologically active metabolites, the composition of three highly effective target consortia of microorganisms for microbial conversion of corn flour is experimentally substantiated [2]. Bioconversion of fermentaiton corn flour with the help of created consortiums allows to shorten the process of biosynthesis from 72 to 32 to 36 hours compared to monoculture.

The spectrum of antimicrobial activity of culture liquids and consortia was studied. The content of substances with antimicrobial properties against microorganisms causing diseases of the gastrointestinal tract of animals was established. Up to 12,4 mg/dm³ of bacteriocin-like substances are detected in the culture liquid of the consortia, which causes the antimicrobial properties of the feed additives obtained.

A method of enzymatic treatment of corn flour based on α -amylase, allowing to obtain a high yield of biomass. Using the method of directed cultivation of microbial conversion of fermentolysis corn flour consortia of bacteria it is possible to get a feed additive with a simultaneously high yield of biologically active substances and biomass [3].

Optimized nutrient media based on corn flour for the cultivation of new consortia of lactic acid bacteria were developed, technological parameters of the process of biosynthesis of target products were established.

This study was performed in the framework of the state assignment topic No. 0529-2019-0066.

References:

1. Newltem M. N. *Fundamentals of biotechnology of agricultural products processing* // Penza: RIO pgskha, - 2015. - 21s.
2. Likhovid P. V. *Prospects of use of corn sugar in forage / / Ways to improve irrigated agriculture*. - 2016. - №1 (61). - P. 213-215.
3. Sleep O. M. *the Use of waste grain processing industry in microbiological synthesis of feed protein* // *Storage and processing of agricultural products*. - 2016. - №12. - P. 24-27.

УДК 606: 613: 615.322: 664.6/.7

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕКСНЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Мирзаев М.Н.¹, Мельницкая Т.И.¹, Мирзаева К.М.², Зверьков Д.А.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия
109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

²Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственное объединение «ЭКОБИОВЕТ», Москва, Россия

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23, стр.8

email: niacid@yandex.ru

В данной работе представлены результаты исследований по разработке композиции, содержащей биологически активные вещества (меланины, органические кислоты) и предназначенной для использования при разработке БАД.

Ключевые слова: меланины, биологически активные добавки, органические кислоты, гепатопротектор.

В связи с интенсификацией сельского хозяйства на основе широкого применения различных химических и антибиотиков, а также внедрением современных промышленных технологий переработки продовольствия происходит не только загрязнение окружающей среды, но и снижение качества продуктов питания. Вследствие этого появляется огромное количество людей, в том числе и детей, которые страдают аллергией, имеют низкие показатели здоровья. Поэтому для профилактики упомянутых заболеваний разрабатываются специализированные пищевые добавки [1, 2].

На основе экспериментальных данных нами выявлены технологические параметры выделения меланинов гречихи и получения их комплекса с органическими кислотами (молочная, янтарная, фумаровая, пропионовая) – метаболитами живых организмов. В опытах на лабораторных грызунах и на перепелах КФХ «Сказка» Рязанской области показано, что разработанная композиция обладает иммуностимулирующим и гепатопротекторным действием. Значительное снижение токсического действия некондиционного корма на перепелов, которым с кормом давали разработанную композицию, свидетельствует о ее высоких протекторных свойствах. Содержание каротиноидов и витаминов А и Е в яйцах перепелов, получавших композит, значительно выше по сравнению с контролем, а средняя масса яйца перепелов контрольной группы составляла $9,24 \pm 3,39$ г, у перепелов, получавших композит – $11,7 \pm 3,99$ г.

Таким образом, разработанная композиция, содержащая в своем составе растительные меланины и природные органические кислоты, может быть использована при разработке новых рецептур функционального питания.

Литература:

1. Мирзаева К.М., Мельницкая Т.И., Мирзаев М.Н., Бессарабова Е.В., Молокова Е.И. Протекторные свойства растительных меланинов (Мелавит) // Материалы VIII международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М., 2015. - Ч.2. - С. 151-152.
2. Язев С.Г. Использование лузги гречихи в пищевом производстве // Наука и современность. - 2014. - №36. - С. 102-105.

UDC 606: 613: 615.322: 664.6/.7

RECEIVING THE COMPONENTS OF COMPLEX FOOD ADDITIVES BASED ON MELANINES AND ORGANIC ACIDS

Mirzaev M.N.¹, Melnitskaya T.I.¹, Mirzaeva K.M.², Zverkov D.A.²

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin",
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23

²Limited Liability Company Scientific Production Association «ECOBIOVET», Moscow, Russia
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23 bldg. 8
email: niacid@yandex.ru

This paper presents the results of research on the development of a composition containing biologically active substances (melanins, organic acids) and intended for use in the development of dietary supplements.

Key words: melanins, dietary supplements, organic acids, hepatoprotector.

In connection with the intensification of agriculture on the basis of the widespread use of various chemicals and antibiotics, as well as the introduction of modern industrial food processing technologies, not only environmental pollution occurs, but also a decrease in the quality of food. As a result, a huge number of people, including children who suffer from allergies, have low health indicators. Therefore, for the prevention of these diseases, specialized food additives are being developed [1, 2].

On the basis of experimental data, we identified technological parameters for the isolation of buckwheat melanins and the preparation of their complex with organic acids (lactic, succinic, fumaric, propionic) - metabolites of living organisms. In experiments on laboratory rodents and on quails of the KFH "Skazka" of the Ryazan Region, it was shown that the developed composition has an immunostimulating and hepatoprotective effect. A significant decrease in the toxic effect of substandard feed on quails, which with the feed was given the developed composition, indicates its high protective properties. The content of carotenoids and vitamins A and E in quail eggs treated with the composite is significantly higher compared to the control, and the average egg weight of quails in the control group was 9.24 ± 3.39 g, in quails treated with the composite - 11.7 ± 3.99 .

Thus, the developed composition containing vegetable melanins and natural organic acids in its composition can be used in the development of new formulations of functional nutrition.

References:

1. Mirzaeva K.M., Melnitskaya T.I., Mirzaev M.N., Bessarabova E.V., Molokova E.I. Protector properties of plant melanins (Melavit) // *Proceedings of the VIII International Congress "Biotechnology: state and development prospects."* M., 2015. - P.2. - C.151-152.
2. Yazev S.G. The use of buckwheat husk in food production // *Science and Modernity.* - 2014. - №36. - P.102-105.

УДК 665.372

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОЭНЗИМА Q10 С ПОСЛЕДУЮЩИМ ОБОГАЩЕНИЕМ КИСЛОМОЛОЧНОГО НАПИТКА НА ОСНОВЕ ЗАКВАСКИ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Морозова О.В.¹, Забодалова Л.А.²

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; 191002, г. Санкт-Петербург, улица Ломоносова, д.9

¹магистрант Университет ИТМО
e-mail: Olchekboch@gmail.com

²профессор, дтн, Университет ИТМО
e-mail: zabodalova@gmail.ru

Липосомальная эмульсия коэнзима Q10 была получена двумя методами: дегидратации/регидратации и тепловым. В ходе сравнения двух образцов было выявлено, что липосомальная эмульсия, полученная тепловым методом, в большей степени удовлетворяет требованиям пищевой промышленности. Выбранный

образец был использован в качестве БАДа для обогащения кисломолочного продукта на основе закваски бифидобактерий.

Ключевые слова: липосомальная эмульсия, липосома, молочная промышленность, пищевая промышленность, бифидобактерии, метод дегидратации/регидратации, тепловой метод.

Липосомы получали классическим методом дегидратации/регидратации и тепловым методом. Материалом служил соевый лецитин, содержащий 97% фосфолипидов ULTRALEC F, компании ADM, США и инкапсулируемый компонент – убихинон композитум. Фракционно-дисперсный состав липосомальной эмульсии исследовали с применением лазерного корреляционного спектрометра ЛКС-03. По полученным данным можно судить о том, что наиболее выгодно использовать тепловой метод. В ходе хранения наблюдалось явление агрегации и изотермической перегонки. Однако преобладающая по размеру везикул фракция не претерпевала значительных изменений на протяжении 7 суток: изменение процента светорассеяния на 1, 3, 7 сутки соответственно 67; 68; 67 % с изменением среднего диаметра 409; 508; 573 нм, соответственно.

Внесение липосомальной эмульсии производилось в кисломолочный продукт на основе пахты и закваски бифидобактерий. Повышение биохимических и культуральных свойств бифидобактерий достигалось путём внесения пастеризованного морковного сока. Внесение липосомальной эмульсии в количестве 5% не вызывает негативных последствий в продукте, что доказано рядом исследований физико-химических и реологических свойств.

Литература:

1. Григорьева А.С. Современная нанофармакология: липосомные технологии в клинике / А.С. Григорьева, Н.Ф. Конахович, Ю. М. Краснопольский // Международное общество липосом. – 2009/ Достижения липосом: прогресс в области доставки лекарств и вакцин 12-15 декабря 2009 года. Лондон. - С. 70–71
2. Липосомы: практический подход. Второе издание. / Под редакцией В.П. Торчилин, В. Вайсиг / Оксфорд: издательство Оксфордского университета. - 2003. - 396 с.
3. Липосомальные наночастицы как носители лекарственных препаратов / А.Е. Шахмаев, И.В. Волчик, Ю.М. Краснопольский [и др.] // Фармаком. – 2011. – № 3. – С. 88–95.

УДК 577.352.2:615.015

OBTAINING A LIPOSOMAL FORM OF COENZYME Q10 WITH THE SUBSEQUENT ENRICHMENT OF A FERMENTED MILK DRINK BASED ON THE FERMENT OF BIFIDOBACTERIA

Morozova O.V.¹, Zabodalova L.A.²

*St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics
191002, St. Petersburg, Lomonosov Street, 9*

¹Master student ITMO University
e-mail: Olchekboch@gmail.com

²Professor, Doctor of Technical Sciences, ITMO University
e-mail: zabodalova@gmail.ru

Liposomal emulsion of coenzyme Q10 was obtained by two methods: dehydration / rehydration and heat. During the comparison of two samples, it was found that the liposomal emulsion obtained by the thermal method, to a greater extent meets the requirements of the food industry. The selected sample was used as a dietary supplement for the enrichment of a fermented milk product based on the ferment of bifidobacteria.

Key words: liposomal emulsion, liposome, dairy industry, food industry, bifidobacteria, dehydration / rehydration method, thermal method.

Liposomes were obtained using the classical dehydration / rehydration method and the thermal method. The material used was soy lecithin containing 97% phospholipids ULTRALEC F, manufactured by ADM, USA, and the encapsulated component ubiquinone compository. The fractional composition of the liposomal emulsion was investigated using a laser correlation spectrometer LKS-03. According to the data obtained, it is possible to judge that it is most advantageous to use the thermal method. During storage, the phenomenon of aggregation and

isothermal distillation was observed. However, the fraction prevailing in the size of the vesicles did not undergo significant changes over the course of 7 days: the change in the percentage of light scattering on days 1, 3, and 7, respectively, 67; 68; 67% with a change in average diameter of 409; 508; 573 nm, respectively.

The introduction of the liposomal emulsion was carried out in a fermented milk product based on buttermilk and the ferment of bifidobacteria. An increase in the biochemical and cultural properties of bifidobacteria was achieved by adding pasteurized carrot juice. The introduction of a liposomal emulsion in the amount of 5% does not cause negative effects in the product, as evidenced by a number of studies of physicochemical and rheological properties.

References

1. Grygorieva A.S. *Real Nanopharmacology: Liposomic medicines in clinic* / A.S. Grygorieva, N.F. Konakhovych, Yu. M. Krasnopolsky // *International Liposome Society. – 2009. MEETING. Liposome Advances: Progress in drug and Vaccine Delivery 12–15 of December 2009. London. – P. 70–71*
2. *Liposomes: A Practical Approach. Second Edition.* / Edited by V.P. Torchilin, V. Weissig / Oxford: Oxford University Press. – 2003. – 396 p
3. *Liposomal nanoparticles as carriers of medicinal preparations* / A.E. Shakhmaev, I.V. Volchik, Yu.M. Krasnopolsky [et al.] // *Farmakom.* - 2011. - № 3. - p. 88–95.

УДК 663.15

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО ШТАММА *TRICHODERMA REESEI* С УВЕЛИЧЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ КСИЛАНАЗЫ И ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ

Костылева Е.В., Цурикова Н.В., Середа А.С., Великорецкая И.А., Айсина А.М.

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

С помощью гамма-мутагенеза получен новый штамм *T. reesei*-Co-44 с увеличенной активностью ксиланазы и эндоглюканазы. Показана эффективность применения ферментного комплекса *T. reesei*-Co-44 для снижения вязкости экстракта ржаной муки.

Ключевые слова: штамм, гидролиз

В России основной сырьевой базой для многих отраслей пищевой промышленности, а также для кормопроизводства, являются зерновые культуры: пшеница, рожь, ячмень, овес и др., с высоким содержанием некрахмальных полисахаридов (НКП), главным образом, арабиноксилана, β -глюкана и целлюлозы. НКП увеличивают вязкость водно-мучных суспензий, что в пищевой промышленности приводит к снижению эффективности технологических процессов и качества конечных продуктов, а в составе кормов негативно влияет на организм моногастричных животных и птицы, снижает кормовую ценность и усвояемость рационов.

В связи с этим для переработки зернового сырья широко используются ферментные препараты (ФП) целлюлаз и гемицеллюлаз, способных гидролизовать НКП зерна. При этом наибольшей эффективностью характеризуются ФП с высоким содержанием карбогидраз эндодеполимеразного действия – эндоглюканазы и ксиланазы, расщепляющих внутренние связи в НКП зерна, быстро снижая степень их полимеризации и вязкость субстратов. Современной тенденцией является получение ФП с увеличенной долей эндодеполимераз за счет уменьшения содержания экзодеполимераз – целлобиогидролаз, β -глюкозидазы.

Во ВНИИПБТ проведены исследования по повышению активности ксиланазы и эндоглюканазы промышленного продуцента целлюлаз и гемицеллюлаз *T. reesei* BCM 18.2/KK. Ранее в результате дробного УФ-мутагенеза был получен штамм *T. reesei* 28-Y-12 с увеличенной активностью эндоглюканазы и ксиланазы на 30 и на 80%, соответственно. Многоэтапный гамма-мутагенез штамма *T. reesei* УФ-12 позволил увеличить активность эндоглюканазы в 4 раза, ксиланазы – в 4,7 раз (рис. 1). Получен штамм *T. reesei*-Co-44 – высокоактивный продуцент ксиланазы и эндоглюканазы для обработки зернового сырья.

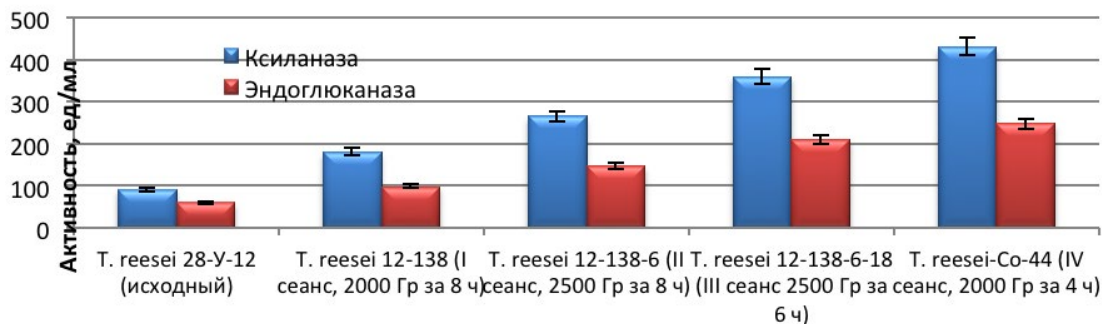


Рис. 1. Повышение активности ксиланазы и эндоглюканазы штамма *T.reesei*-28-Y-12 на различных этапах гамма-мутагенеза.

Эффективность ферментного комплекса нового мутантного штамма *T.reesei*-Co-44 при гидролизе НКП зерна оценивали по снижению вязкости экстракта ржи, отличающейся высоким содержанием арабиноксилана и способностью образовывать растворы высокой вязкости. Фильтрат культуральной жидкости (КЖ), полученной при глубинном культивировании *T.reesei*-Co-44 в колбах, использовали для гидролиза нативного экстракта ржаной муки в сравнении с коммерческим препаратом Целлолюкс А. Дозировку препаратов уравнивали по активности ксиланазы из расчета 0,25 ед. на 1 мл экстракта. Гидролиз проводили при 25°C в течение 20 мин, вязкость определяли на вибрационном вискозиметре AND SV-10. В результате гидролиза коммерческим препаратом относительная вязкость мучной суспензии снизилась на 59%, при использовании фильтрата КЖ мутантного штамма – на 67%, что подтверждает высокую эффективность ферментного комплекса нового мутантного штамма *T.reesei*-Co-44 при гидролизе НКП злаков.

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019 - 2021 годы (тема № 0529-2019-0066).ч

UDC 663.15

OBTAINING A NEW TRICHODERMA REESEI STRAIN WITH INCREASED XYLANASE AND ENDOGLUCANASE ACTIVITY FOR GRAIN RAW MATERIALS TREATMENT

Kostyleva E.V., Tsurikova N.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Aisina A.M.

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

Using gamma mutagenesis, a new strain *T. reesei*-Co-44 was obtained with increased xylanase and endoglucanase activity. The efficiency of using *T. reesei*-Co-44 enzyme complex to reduce the viscosity of rye flour extract is shown.

Key words: strain, hydrolysis

In Russia, the main source of raw materials for many branches of the food industry, as well as for fodder production, are cereals: wheat, rye, barley, oats, etc., with a high content of non-starch polysaccharides (NSP), mainly arabinoxylan, β -glucan and cellulose. NSP increase the viscosity of water-flour suspensions. In the food industry it leads to a decrease in the technological processes efficiency and the quality of final products. As a part of feed, NSP negatively affect the organism of monogastric animals and poultry, reduce the feed value and digestibility of diets.

In this regard, for the grain raw materials processing enzyme preparations (EP) of cellulases and hemicellulases that can hydrolyze cereal NSP are widely used. EP with a high content of endoglucanases and xylanases possess the highest efficiency. Endoglucanases and xylanases being carbohydrases of endodepolymerase action cleave internal bonds in the NSP of grain, quickly reducing their polymerization degree and the substrates viscosity. The current trend is to obtain EP with an increased proportion of endodepolymerases reducing the content of exodepolymerases (cellobiohydrolase, β -glucosidase).

We conducted studies to increase the xylanase and endoglucanase activity of an industrial producer of

cellulases and hemicellulases – *T. reesei* BCM 18.2/KK strain. Earlier, as a result of fractional UV mutagenesis, the *T. reesei* 28-U-12 strain was obtained with an increased activity of endoglucanase and xylanase by 30% and 80%, respectively. Multi-stage gamma mutagenesis of *T. reesei* UV-12 allowed us to further increase the activity of endoglucanase by 4 times, xylanase by 4.7 times (Fig. 1). The *T. reesei*-Co-44 strain – highly active producer of xylanase and endoglucanase for grain raw materials processing was obtained.

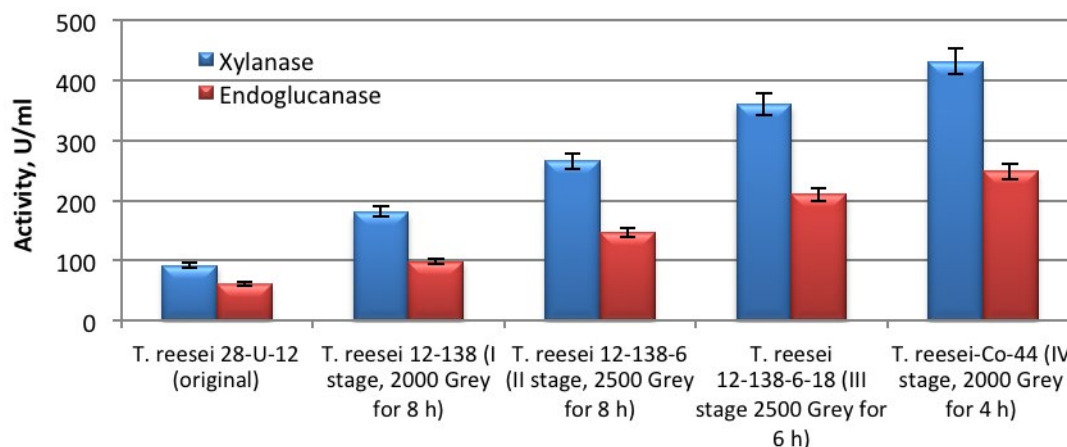


Fig. 1. Increase of xylanase and endoglucanase activity of *T. reesei*-28-U-12 strain at different stages of gamma-mutagenesis.

The effectiveness of *T. reesei*-Co-44 enzyme complex in cereal NSP hydrolysis was evaluated by reduction of viscosity of rye extracts, characterized by high arabinoxylan content and the ability to form high viscosity solutions. The filtrate of the culture liquid (CL) obtained by submerged cultivation of the new mutant strain *T. reesei*-Co-44 in flasks was used to hydrolyze the native extract of rye flour in comparison with the commercial preparation Cellolux A. The preparations dosage was equalized by xylanase activity (0.25 units per 1 ml of extract). The hydrolysis was carried out at 25°C for 20 min, the viscosity was determined using a vibration viscometer AND SV-10. The hydrolysis of rye extracts with Cellolux A resulted in the relative viscosity decrease by 59%, when using the CL filtrate of the mutant strain – by 67%. The data obtained confirm the high efficiency of the enzyme complex of the new mutant strain *T. reesei*-Co-44 in hydrolysis of the cereal NSP.

The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2019-2021 (project no. 0529-2019-0066).

УДК 637.5.039

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА АСТАЦИНА ДЛЯ ОБРАБОТКИ МЯСА

М.Ю. Минаев, А.А. Махова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Россия, 109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26
e-mail: mminaev@inbox.ru

Получен рекомбинантный фермент M12 *Astacus astacus* на основе дрожжевого штамма *Pichia pastoris*. Отмечена специфичная ферментативная активность супернатанта в отношении 40% желатина и белков соединительной ткани мяса.

Ключевые слова: тендеризация мяса, рекомбинантная пептидаза, M12 пептидазы

Ассортимент ферментных препаратов, доступных для промышленного использования мал. Это связано с сокращением числа выпускающих их предприятий и стоимостью имеющихся импортных ферментов (бромелаин, папаин). Одним из отечественных ферментов, способных найти применение в технологии мясопродуктов, является коллагеназа из гепатопанкреаса камчатского краба. Альтернативой коллагеназы из гепатопанкреаса камчатского краба может выступать хорошо изученная протеиназа пищеварительно-

го тракта речного рака *Astacus astacus* – астацин семейства металлопептидаз M12 [1].

В работе описывается изучение возможности использования астацина в качестве фермента для обработки мясного сырья с целью его умягчения.

Астацин – пищеварительный фермент из речного рака – был впервые описан в 1967 году. Термин “астацины” также обозначает пигменты – производные б-каротина, впервые полученные из речного рака [2].

При расщеплении пептидных связей в белковых субстратах астацин проявляет предпочтение к аминокислотным остаткам с короткими боковыми цепями (Ala, Thr, Ser, Gly) в положении P1', к пролину в положениях P2' и P3', к гидрофобным остаткам в положениях P3' и P4'. Субстратами служат также синтетические нитроамидоподобные соединения Suc-Ala-Ala-Ala-NHPhNO [3].

Целью работы являлось получение рекомбинантного фермента астацина семейства M12 с использованием дрожжевого штамма *Pichia pastoris* для его дальнейшего применения в обработке мяса.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая астацин, была оптимизирована под *Pichia pastoris* и синтезирована в IDT как *gBlocks Gene Fragments*. Проведено клонирование оптимизированной последовательности в векторную плазмиду pPic9K с последующей трансформацией *Pichia pastoris*.

Была наработана культуральная жидкость, содержащая рекомбинантный астацин и проведена оценка его ферментативной активности. Установлено, что у рекомбинантного астацина не происходит автокаталитического удаления пропептида и он обладал желатиназной активностью только после активации трипсином. В результате оценки желатиназной активности рекомбинантного астацина была подобрана такая концентрация трипсина, которая удаляла пропептид, но ее было недостаточно для растворения 40% желатина.

Кроме этого была проведена оценка воздействия активированного фермента астацина на мясное сырье. В опытном образце отмечены изменения в структуре соединительной ткани: прослойки перимизия разрыхлены, отмечается их отслоение от мышечных пучков, дезинтеграция фибрилл, их фрагментация. Указанные изменения наиболее выражены по периферии образца. Существенных изменений в структуре мышечных волокон не выявлено.

Таким образом, в результате проведенных гистологических исследований установлено воздействие рекомбинантной пептидазы преимущественно на соединительную ткань мясного сырья. Данное свойство фермента может быть использовано для воздействия на белки соединительной ткани мяса с целью повышения его сортности или для получения белковых гидролизатов.

Литература:

1. Балабан Н.П., Металлоэндопептидазы клана метцинков: классификация, свойства, структурные особенности. – Учебные записки Казанского государственного университета, том 115, кн. 2.
2. Семенова С.А.*, Руденская Г.Н., «Семейство астациновых металлопептидаз», Биомедицинская химия, 2008 том 54, вып. 5, с. 531-554.
3. Электронный ресурс – база данных MEROPS - https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/substrate_index?action=A

UDC 637.5.039

PRODUCTION OF RECOMBINANT ENZYME ASTACIN FOR MEAT PROCESSING

M.Yu. Minaev, A.A. Makhova

V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, 26 Talalikhina street, Moscow, 109316, Russia
e-mail: mminaev@inbox.ru

Recombinant peptidase M12 *Astacus astacus* was obtained on the basis of the yeast strain *Pichia pastoris*. The supernatant was used to evaluate the enzyme activity. Recombinant peptidase broke the 40% of gelatin and connective tissue of meat.

Key words: meat tenderization, recombinant peptidase, M12 family peptidase

The range of enzyme preparations available for industrial use is small. This is due to the reduction in the number of enterprises producing them and the cost of existing imported enzymes (bromelain, papain). One of the domestic enzymes capable to find application in technology of meat products is collagenase from a hepatopancreas of the Kamchatka crab. An alternative to collagenase from the Kamchatka crab hepatopancreas may be well-studied proteinase of the digestive tract of river cancer *Astacus astacus* – astacin of the family of metallopeptidases M12 [1].

The paper describes the study of the possibility of using astacin as an enzyme for processing raw meat to soften it.

Astacin, a digestive enzyme from river cancer, was first described in 1967. The term "astacins" also refers to pigments – derivatives of b-carotene, first obtained from river cancer [2].

When splitting peptide bonds in protein substrates astacin shows preference to amino acid residues with short side chains (Ala, Thr, Ser, Gly) in the position P1', to the Proline in the positions P2' and P3', to hydrophobic residues in the positions P3' and P4'. The synthetic substrates also serve nitroimidazole compound Suc-Ala-Ala-Ala-NHPhNO [3].

The aim of the work was to obtain a recombinant enzyme astacin M12 family using yeast strain *Pichia pastoris* for its further use in meat processing.

The nucleotide sequence encoding astacin has been optimized for *Pichia pastoris* and synthesized in IDT as gBlocks Gene Fragments. The optimized sequence was cloned into a vector plasmid pPic9K with subsequent transformation of *Pichia pastoris*.

The culture liquid containing recombinant astacin was developed and its enzymatic activity was evaluated. It was found that recombinant astacin does not have autocatalytic removal of propeptide and it had gelatinase activity only after trypsin activation. As a result of the evaluation of gelatinase activity of recombinant astacin, such a trypsin concentration was selected, which removed the propeptide, but it was not enough to dissolve 40% gelatin.

In addition, an assessment of the impact of the activated enzyme astacin on meat raw materials was carried out. In the prototype marked changes in the structure of connective tissue: the layer perimete loosened, celebrated their detachment from the muscle bundles, the disintegration of the fibrils, their fragmentation. These changes are most pronounced in the periphery of the sample. No significant changes in the structure of muscle fibers were revealed.

Thus, as a result of histological studies, the effect of recombinant peptidase mainly on the connective tissue of raw meat was established. This property of the enzyme can be used to influence the proteins of the connective tissue of meat in order to increase its grade or to obtain protein hydrolysates.

References:

1. Balaban N.P., *Metalloendopeptidazy klana metcinkov: klassifikaciya, svoystva, strukturnye osobennosti.* – *Uchebnye zapiski Kazanskogo gosudarstvennogo universiteta*, tom 115, kn. 2.
2. Semenova S.A. *, Rudenskaya G.N., «Semeystvo astacinovykh metallopeptidaz», *Biomeditsinskaya himiya*, 2008 tom 54, vyp. 5, s. 531-554.
3. EHlektronnyj resurs – baza dannyh MEROPS - https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/substrate_index?action=A

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА ПРОДУКТА ОБЩЕСТВЕННОГО ПИТАНИЯ

Иванова Л.А., Голидонова К.А., Чурмасова Л.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия
125080, Москва, Волоколамское шоссе, д. 11
e-mail: biotech@mgupp.ru

Получен и апробирован комплексный ферментный препарат на основе штамма дрожжей *Candida parapsilosis* M10-10B для производства хлебопекарных и мучных кондитерских изделий. Показано, что добавление комплексного ферментного препарата в рецептуру сдобных пирогов с картофельной начинкой, разработанную для общественного питания, привело к значительному улучшению потребительских качеств готовых изделий.

Ключевые слова: комплексный ферментный препарат, дрожжи, активности ферментов, общественное питание

В настоящее время ферментные препараты широко применяются в различных отраслях пищевой промышленности: хлебопекарной, спиртовой, пивоваренной, винодельческой и др., а также в производстве мучных кондитерских изделий.

Использование ферментных препаратов в технологиях пищевых продуктов повышает их качество, ускоряет технологические процессы, сокращает сроки производства, способствует интенсификации желаемых биотехнологических процессов [1].

Качество хлебобулочных и мучных кондитерских изделий определяется химическим составом муки и активностью ферментативного комплекса в системе тесто-дрожжи.

Получить мучной кондитерский продукт с надлежащими органолептическими свойствами можно только при правильном сочетании микробиологических и биохимических процессов при приготовлении теста.

Эффективным решением многих технологических задач в хлебопечении и в производстве мучных кондитерских изделий, в том числе получение широкого ассортимента хлебобулочных изделий высокого качества, является целенаправленное применение пищевых добавок и улучшителей, в том числе и ферментных препаратов комплексного действия [2]. В общественном питании ферментные препараты практически не применяются.

На кафедре «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» МГУПП была разработана технология комплексного ферментного препарата на основе штамма дрожжей *Candida parapsilosis* M10-10B для производства хлебобулочных и мучных кондитерских изделий. В результате проведенных исследований был установлен оптимальный состав питательной среды для синтеза ферментов амилалитического, протеолитического, липолитического и целлюлолитического действия, а именно в %: оливковое масло – 1,0; дрожжевой экстракт – 1,0; отруби пшеничные – 1,0; соевая мука – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,5; KH_2PO_4 – 0,03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; CaCO_3 – 0,3; твин-80 – 0,2.

Выращивание продуцента проводилось в течение 48 ч при температуре 30°C в аэробных условиях. Путем осаждения изопропанолом активного белка и последующей сушки осадка под вакуумом при температуре 50°C был получен ферментный препарат со следующими активностями ферментов: АС – 165 ед/г; ЛС- 4000 ед./г; ПС – 175 ед/г; ЦС – 300 ед/г.

После успешной апробации в технологии хлебобулочных изделий [3] полученный ферментный препарат вводился в рецептуру сдобных пирогов с картофелем, разработанную на кафедре «Технология индустрии питания» ФГБОУ ВО «МГУПП». Контрольные образцы готовились без введения ферментного препарата.

В состав рецептуры входили: мука, сахар, маргарин, соль, дрожжи прессованные и вода. Использовалась концентрация ферментного препарата – 0,1%. Время брожения теста опытного образца уменьшилось на 29%. Объем опытного образца был больше контрольного на 5%. Вкус, аромат, пористость и внешний вид опытного образца были оценены на 1-2 балла выше, чем у контрольного образца.

Таким образом, добавление комплексного ферментного препарата в рецептуру сдобных пирогов с картофельной начинкой, разработанную для общественного питания, привело к значительному улучшению потребительских качеств готовых изделий.

Литература:

1. Иванова Л.А., Войно Л.И., Иванова И.С. Пищевая биотехнология. Кн.2. Переработка растительного сырья (Под ред. Грачевой И.М.). - М.: КолосС. 2008 – 472с.
2. Пашенко Л.П. Биотехнологические основы производства хлебобулочных изделий. - М.: Колос, 2002. – 368с.
3. Иванова Л.А., Гаскарова Е.Ф., Голидонова К.А. Биотехнология получения и применения дрожжевой липазы. /Сборник материалов I международной научно-практической конференции «Развитие пищевой и перерабатывающей промышленности России: кадры и наука. – М.: МГУПП, 2017.- С.72-75.

THE USE OF COMPLEX ENZYME PREPARATION TO IMPROVE THE QUALITY OF THE PRODUCT CATERING

Ivanova L. A., Golidonova K. A., Churmasova L. A.

Federal state budgetary educational institution of higher professional education "Moscow State University of Food Production", Moscow, Russia.

125080, Moscow, Volokolamsk highway, d. 11

e-mail: biotech@mgupp.ru

A complex enzyme preparation based on the yeast strain *Candida parapsilosis* M10-10B for the production of bakery and flour confectionery products was obtained and tested. It is shown that the addition of a complex enzyme preparation in the formulation of butter cakes with potato filling, developed for public catering, has led to a significant improvement in consumer qualities of finished products.

Key words: complex enzyme preparation, yeast, enzyme activity, public catering

Nowadays, enzyme preparations are widely used in various sectors of the food industry: bakery, alcohol, brewing, wine, etc., as well as the production of flour confectionery.

The use of enzyme preparations in food technologies improves their quality, accelerates technological processes, reduces production time, contributes to the intensification of the desired biotechnological processes [1].

The quality of bakery and flour confectionery products is determined by the chemical composition of flour and the activity of the enzymatic complex in the dough-yeast system.

The obtainment of a flour confectionery product with proper organoleptic features is possible only with the right combination of microbiological and biochemical processes in the preparation of the test.

An effective solution to many technological problems in baking and in the production of flour confectionery products, including a wide range of high quality bakery products, is the purposeful use of food additives and improvers, including enzyme preparations of complex action [2]. In public catering enzyme preparations are practically not used.

A technology of complex enzyme preparation based on yeast strain *Candida parapsilosis* M10-10V for the production of bakery and flour confectionery products was developed at the Department of "Biotechnology and technology of Bioorganic synthesis products" MSUFP. As a result of the research, the optimal composition of the nutrient medium for the synthesis of enzymes of amylolytic, proteolytic, lipolytic and cellulolytic action was established, particularly in %: olive oil-1,0; yeast extract-1,0; wheat bran-1,0; soy flour-1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -0,5; KH_2PO_4 -0,03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.02; CaCO_3 - 0.3; tween-80 - 0.2.

Cultivation of the producer was carried out for 48 hours at a temperature of 30°C in aerobic conditions. By isopropanol deposition of the active protein and subsequent drying of the precipitate under vacuum at a temperature of 50°C, an enzyme preparation with the following enzyme activities was obtained: AC-165 u / g; LS-4000 u/g; PS-175 u/g; CS - 300 u / g.

After successful testing in the technology of bakery products [3], the enzyme preparation was introduced into the recipe of butter cakes with potatoes, developed at the Department of "technology of the food industry" FGBOU VO "MGUPP". Control samples were prepared without the enzyme preparation.

The composition of the formulation included: flour, sugar, margarine, salt, compressed yeast and water. The concentration of the enzyme preparation was 0.1%. The fermentation time test of the prototype decreased by 29%. The volume of the prototype was more than the test one by 5%. The taste, smell, porosity and appearance of the prototype was 1-2 points higher than the test sample.

Thus, the addition of a complex enzyme preparation in the formulation of butter cakes with potato filling, developed for public catering, led to a significant improvement in the consumer qualities of finished products.

References:

1. Ivanova L.A., Voino L. I., Ivanova I. S. *Food biotechnology. b.2. Processing of plant materials* (ed. by I. M. Gracheva). -M.: Kolos. 2008-472p.
2. Pashchenko L. P. *The Biotechnological basis for the production of bakery products*. -M.: Kolos, 2002. – 368p.
3. Ivanova L. A., Gaskarova T.F., Golidonova K. A. *Biotechnology for the production and use of yeast lipase. / Proceedings of the I international scientific and practical conference "The development of food and processing industry in Russia: personnel and science". – M.: MGUPP, 2017. - P. 72-75.*

УДК 664.651

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ НОВЫХ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ ЯГОДНОГО И МИКРОБНОГО СЫРЬЯ

Волкова Г.С., Серба Е.М., Соколова Е.Н., Фурсова Н.А., Погорельская Н.С.

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: galina.volkova@bk.ru

Разработаны биотехнологические схемы получения новых пищевых ингредиентов на основе глубокой переработки растительного и микробного сырья, содержащего белок, незаменимые аминокислоты, биоактивные пептиды и витамины.

Ключевые слова: брусника, облепиха, дрожжевая биомасса, биокаталитическая конверсия, пищевые ингредиенты, биологически активные вещества

Установлены особенности воздействия ферментов, катализирующих конверсию пектиновых веществ, на выход сока из ягодного сырья, его вязкость, содержание в нем экстрактивных сухих веществ, растворимых редуцирующих углеводов и фенольных веществ [1]. Подобраны оптимальные условия биоконверсии ягод облепихи и ягод брусники.

Выявлено, что в результате биокаталитической конверсии выход сока-самотека из ягод облепихи превысил контрольный уровень на 5,6 – 44%. Установлено, что в брусничном соке, полученном с применением ферментных препаратов содержание титруемых кислот увеличивается в 1,1-1,15 раза, редуцирующих веществ (в пересчете на глюкозу) в 1,2-1,55 раза, витамина С в 1,1-1,3 раза, каротиноидов (в пересчете на Р-каротин) в 2,3-2,7 раза, выхода фенольных компонентов на 18-20% по сравнению с соком, полученным без применения ферментных препаратов.

Подобран ферментативный комплекс протеазы и β-полигалактуроназы для эффективной биокаталитической конверсии дрожжевой биомассы. При времени ферментализации 12 ч при 35°C, достигается степень гидролиза белка 60-100%.

Разработаны принципиальные технологические схемы и режимы получения ферментализатов ягод брусники и облепихи [2], а также ферментализата дрожжевой биомассы (штаммы Y-3439, YD-53 и № 581) с применением оптимальных ферментативных комплексов.

Установлено, что применение ферментативной обработки позволяет увеличить содержание свободных аминокислот в ферментализатах: облепихи – на 35%, брусники – на 11%, штамм дрожжей Y-3439 – на 38,6%, штамм дрожжей Y-53 – на 42,6%.

Разработан алгоритм получения белково-аминокислотных и биологически активных пищевых ингредиентов для различных вариантов комплексной переработки растительного сырья [3] и микробной биомассы.

Новые пищевые ингредиенты содержат природные компоненты и расширяют ассортимент продуктов, необходимых для оптимизации нутриома человека, поддержания микробиома у здоровых людей и для профилактики потери нутриентов у спортсменов и людей, работающих в экстремальных условиях.

Исследования проведены по программе научных исследований Президиума Российской академии наук, тема № 529-2018-0111

Литература:

1. Алексеенко Е.В. Ферментативная биоконверсия плодово-ягодного сырья: биохимические аспекты и практическое применение // *Хранение и переработка сельхозсырья*. - 2012. - № 3. - С. 49-52.
2. Причко, Т.Г. Использование плодов облепихи для разработки консервов функционального назначения / Т.Г. Причко, Л.Д. Чалай, Н.В. Дрофичева // *Хранение и переработка сельхозсырья*. - 2012 - №7. - С. 53-56.
3. Чернобровин Д.Ю., Алексеенко Е.В., Траубенберг С.Е., Осташенкова Н.В., Чернобровина А.Г. Биокатализ ягод брусники для применения в пищевых технологиях // *Хранение и переработка сельхозсырья*. -2011,- № 2.- С. 57-60.

UDC 664.651

BIOTECHNOLOGY DEVELOPMENT OF NEW FOOD INGREDIENTS BASED ON BERRY AND MICROBIAL RAW MATERIALS

Volkova G. S., Serba E. M., Sokolova E. N., Fursova N.A., Pogorzelskaya N.S.

*All-Russian research Institute of food biotechnology-branch of the Federal state budgetary institution of science of the Federal research center of food, biotechnology and food safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, 4B Samokatnaya str.,
e-mail: galina.volkova@bk.ru*

Biotechnological schemes for obtaining new food ingredients based on deep processing of plant and microbial raw materials containing protein, essential amino acids, bioactive peptides and vitamins have been developed.

Key words: cranberries, sea buckthorn, yeast biomass, biocatalytic conversion, food ingredients, biologically active substances

The features of the effect of enzymes catalyzing the conversion of pectin substances on the yield of juice from berry raw materials, its viscosity, the content of extractive solids, soluble reducing carbohydrates and phenolic substances [1]. The optimal conditions for bioconversion of sea buckthorn berries and cranberries are selected.

It was revealed that as a result of biocatalytic conversion the yield of juice-gravity from sea buckthorn berries exceeded the control level by 5.6 – 44%. It was found that in cowberry juice obtained with the use of enzyme

preparations, the content of titrated acids increases by 1.1-1.15 times, reducing substances (in terms of glucose) by 1.2-1.55 times, vitamin C by 1.1-1.3 times, carotenoids (in terms of P-carotene) by 2.3-2.7 times, the yield of phenolic components by 18-20% compared with juice obtained without the use of enzyme preparations.

Enzyme complex of protease and β -polygalacturonase was selected for effective biocatalytic conversion of yeast biomass. At the time of fermentolysis of 12 h at 350C, the degree of hydrolysis of the protein is 60-100%.

Developed principal technological schemes and modes of obtaining fermentation berries of a cowberry and sea buckthorn [2], as well as ferment lysis yeast biomass (strains Y-3439, YD-53 and No. 581) with the use of optimal enzymatic complexes.

It was found that the use of enzymatic treatment allows increasing the content of free amino acids in fermentolizates: sea buckthorn – by 35%, cranberries – by 11%, yeast strain Y-3439 – by 38.6%, yeast strain Y-53 – by 42.6%.

An algorithm for obtaining protein-amino acid and biologically active food ingredients for different variants of complex processing of plant raw materials [3] and microbial biomass has been developed.

New food ingredients contain natural ingredients and expand the range of products needed to optimize nutritive person, maintaining a microbiome in healthy people and to prevent loss of nutrients in athletes and people working in extreme conditions.

The research was carried out within the framework of Program of scientific research of the Presidium of the Russian Academy of Sciences, project № 529-2018-0111.

References:

1. Alekseenko E. V. Enzymatic bioconversion of fruit and berry raw materials: biochemical aspects and practical application // Storage and processing of agricultural raw materials. - 2012. - № 3. - P. 49-52.
2. Pricco, T. G. the Use of sea buckthorn fruits for the elaboration of canned food of a functional purpose / Pricco, T. G., Chalaya L. D., N. In. Drofichev // Storage and processing of agricultural products. - 2012 - №7.- P. 53-56.
3. Chernobrovina, D. Yu, Alekseenko E. V., Trautenberg S.E., N Astashenkova. In. Chernobrovina A. G. Biocatalysis berries cranberries for use in food technology // Storage and processing of agricultural products. -2011, no.2.- P. 57-60.

УДК 577.1; 577.1.08

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ ФТОРХИНОЛОНОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Рязанов А.А.¹, Зверева Е.А.¹, Гендриксон О.Д.¹, Шанин И.А.², Жердев А.В.¹, Дзантиев Б.Б.¹

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

119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33

²ООО «Хема», 105264, Москва, 9-я Парковая ул., д. 48

e-mail: ryazanov95@icloud.com

Разработаны методы иммунохроматографического анализа для детекции антибиотиков группы фторхинолоны в продуктах питания. Методы апробированы для контроля контаминации молочной продукции.

Ключевые слова: иммунохроматография, антибиотики, фторхинолоны, молочные продукты

Характеристика молочного сырья и готовой продукции на наличие/отсутствие антибиотиков является обязательным условием при производстве продуктов питания. Использование иммунохроматографических тест-систем (ИХТС) позволяет проводить такой скрининг экспрессно и с высокой эффективностью. Проведенные исследования были направлены на разработку и характеристику ИХТС для контроля антибиотиков класса фторхинолонов (левофлоксацин, ципрофлоксацин, клинафлоксацин, данофлоксацин и др.).

Для реализации тест-систем были синтезированы конъюгаты наночастиц золота с поликлональными антителами. Определены оптимальные мембранные носители для работы с пробами молока. Разработаны протоколы иммобилизации конъюгатов гаптен-(белок-носитель). Установлены концентрации реагентов, обеспечивающие достоверную визуальную оценку окрашивания индикаторных линий. На основании результатов оптимизации были изготовлены тест-полоски и проведена их апробация для контроля присутствия фторхинолонов в пробах молока. Так, тест-система на ципрофлоксацин характеризуется пределом детекции 20 пг/мл и продолжительностью анализа 15 мин.

Благодаря экспрессности и методической простоте разработанные тест-системы позволяют принимать оперативные технологические решения при производстве продуктов питания, осуществлять широкий мониторинг готовой продукции и, таким образом, предотвращать риски для здоровья населения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-58-00038).

UDK 577.1; 577.1.08

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR RAPID DETECTION OF FLUOROQUINOLONES IN FOOD PRODUCTS

Ryazanov A.A.¹, Zvereva E.A.¹, Hendricson O.D.¹, Shanin I.A.², Zherdev A.V.¹, Dzantiev B.B.¹

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, 119071, Moscow, Russia

²«Хема», 9th Parkovaya street 48, 105264, Moscow, Russia

e-mail: ryazanov95@icloud.com

Methods of immunochromatographic analysis for the detection of antibiotics belonging to fluoroquinolone group in food stuffs have been developed. The methods have been validated as tools to control the contamination of dairy products.

Key words: immunochromatography, antibiotics, fluoroquinolones, dairy products

Characterization of dairy raw materials and ready products for the presence/absence of antibiotics is a prerequisite for the production of food stuffs. Immunochromatographic test systems allow such screening to be carried out rapidly and with high efficiency. The presented work was directed to the development and characterization of immunochromatographic test systems for control of fluoroquinolone antibiotics (levofloxacin, ciprofloxacin, clinafloxacin, danofloxacin, etc.).

For the proposed test systems, conjugates of gold nanoparticles with polyclonal antibodies were synthesized. Optimal membrane carriers for working with milk samples were determined. Protocols for the immobilization of hapten-(carrier protein) conjugates were developed. Concentrations of reagents that provide a reliable visual assessment of the color of indicator lines were established. Based on the results of the optimization, test strips were manufactured and validated for the control of the presence of fluoroquinolones in milk samples. Thus, the test system for ciprofloxacin was characterized by a detection limit of 20 pg/mL and duration time of 15 minutes.

Due to rapidity and methodical simplicity, the developed test systems will allow to make operational technological decisions in food production, to carry out wide monitoring of finished products and, thus, to prevent risks to public health.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant 18-58-00038).

УДК 663.5:663.8

РАЗРАБОТКА НАУЧНЫХ ОСНОВ НАПРАВЛЕННОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК РАСТИТЕЛЬНОГО И МИКРОБНОГО СЫРЬЯ С ЦЕЛЮ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ

Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Курбатова Е.И., Фурсова Н.А., Юраскина Т.В., Волкова Г.С.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

111033, Москва, ул. Самокатная, д. 46

e-mail: elenaniksokolova@inbox.ru

Разработана биотехнология получения натуральных пищевых ингредиентов на основе ферментативной деструкции клеточных стенок растительного и микробного сырья

Ключевые слова: биокаталитические системы, натуральные пищевые ингредиенты, концентраты, плодово-ягодное сырьё, ферментативный катализ

Для инновационного развития производства пищевых ингредиентов в ближайшей перспективе наиболее целесообразно использовать биотехнологические методы их получения.

Биотехнологические производства более экологичны, чем химические. Необходимо принять во внимание, что Правительством России в 2012 году была принята Комплексная программа развития биотехнологий в стране на период до 2022 года, которая ставит одной из своих целей заменить существенную часть продуктов, производимых методом химического синтеза, продуктами биологического синтеза и увеличить объем производства биотехнологической продукции в РФ в 33 раза, сократив импорт такой продукции на 5%.

Из разрешенных в России пищевых ингредиентов на долю продукции, получаемой биотехнологическими методами, приходится менее 7%, что диктует необходимость разработки биотехнологий производства натуральных пищевых ингредиентов на основе направленной ферментативной деструкции растительного и микробного сырья [1].

В результате исследований получены новые экспериментальные данные влияния состава биокаталитических систем на степень деструкции полимеров клеточных стенок дрожжей и свойства получаемых ингредиентов.

Установлена зависимость выхода БАВ из растительного сырья (яблоки, черная смородина, пшеница, цитрусовые) от субстратной специфичности испытанных ферментативных систем.

Разработаны оптимальные условия получения препаративных форм пищевых ингредиентов на основе ферментализатов растительного и микробного сырья с использованием мембранных технологий.

На основе принципов пищевой комбинаторики и в соответствии с нормами физиологических потребностей в пищевых веществах исследована возможность конструирования рецептур комбинированных напитков для различных групп населения [2,3].

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019 - 2021 годы (тема № 0529-2019-0066).

Литература:

1. Поверин Д.И. Научные основы промышленного производства продуктов функционального питания из различных видов растительного сырья. М.: МГУТУ, 2002. 269с.
2. Бакуменко О.Е. Технология обогащенных продуктов питания для целевых групп. Научные основы и технология. М.: ДеЛи плюс, 2013. 287с.
3. Коденцова В.М., Бекетова Н.А., Никитюк Д.Б., Тутельян В.А. Характеристика обеспеченности витаминами взрослого населения Российской Федерации // Профилактическая медицина. – 2018. - № 21(4). - С. 32-37.

UDC 663.5:663.8

DEVELOPMENT OF SCIENTIFIC BASES OF DIRECTION ENZYMATIC DEGRADATION OF CELL WALLS OF PLANT AND MICROBIAL RAW MATERIALS FOR CREATION BIOTECHNOLOGY OF FOOD INGREDIENTS

Sokolova E.N., Borshcheva Yu.A., Kurbatova E.I., Fursova N.A., Yuraskina T.V., Volkova G.S.

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, Moscow, Russia
111033, Moscow, Samokatnaya, 4b
e-mail: elenaniksokolova@inbox.ru

The biotechnology of obtaining natural food ingredients based on the enzymatic destruction of cell walls of plant and microbial raw materials has been developed.

Key words: biocatalytic systems, natural food ingredients, concentrates, fruit and berry raw materials, enzymatic catalysis

For innovative development of the production of food ingredients in the near future it is more advisable to use biotechnological methods.

Biotechnology production is more environmentally friendly than chemical. It is important that in 2012 Russian government adopted The Comprehensive Program for Development of Biotechnology in the country through 2022,

the purpose of which replace a significant part of chemical synthesis products to biological synthesis products and increase production of biotechnological products in Russia in 33 times, and thereby to reduce the import of such products by 5%.

Of the food ingredients allowed in Russia, the share of products obtained by biotechnological methods accounts for less than 7%, which dictates the need to develop biotechnologies for the production of natural food ingredients based on targeted enzymatic destruction of plant and microbial raw materials [1].

As a result of research, new experimental data to influence the composition of biocatalytic systems on the degree of yeast cell wall polymers degradation and the properties of the resulting ingredients have been obtained.

The dependence of the yield of biologically active substances of plant materials (apples, black currants, wheat, citrus fruits) from the substrate specificity of the tested enzyme systems has been established.

Optimal conditions for the preparation of preparative forms of food ingredients based on fermentolysates of plant and microbial raw materials using membrane technologies have been developed.

On the basis of the principles of food combinatorics and in accordance with the norms of physiological requirements for nutrients, the possibility of designing formulations of combined drinks for different groups of people has been investigated [2,3].

The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2019-2021 (project no. 0529-2019-0066).

References:

1. Poverin D.I. *Nauchnye osnovy promyshlennogo proizvodstva produktov funktsional'nogo pitaniya iz razlichnykh vidov rastitel'nogo syr'ya*. M.: MGUTU, 2002. 269s.
2. Bakumenko O.E. *Tekhnologiya obogashchennykh produktov pitaniya dlya tselyvykh grupp*. Nauchnye osnovy i tekhnologiya. M.: DeLi plus, 2013. 287s.
3. Kodencova V.M., Beketova N.A., Nikityuk D.B., Tutel'yan V.A. *Harakteristika obespechennosti vitaminami vzroslogo naseleniya Rossijskoj Federacii // Profilakticheskaya medicina*. – 2018. – № 21(4). – S. 32-37.

УДК 637.5.039

РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЕПТИДАЗА *AEROMONAS SALMONICIDA* – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТ ДЛЯ ТЕНДЕРИЗАЦИИ МЯСА

Минаев М.Ю., Махова А.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Россия, 109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26
 e-mail: aeremtsova@gmail.com

Получена рекомбинантная пептидаза M9 *Aeromonas salmonicida* на основе дрожжевого штамма *Pichia pastoris*. Отмечена специфичная ферментативная активность супернатанта в отношении одной из последовательности коллагеновой цепи – «Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg», отсутствовала «общая протеолитическая» активности.

Ключевые слова: тендеризация мяса, рекомбинантная пептидаза, M9 пептидазы

Особый интерес для исследования коллагеназной активности представляет семейство металлопротеаз M9 (база данных MEROPS), типичными продуцентами которого являются патогенные микроорганизмы *Clostridium histolyticum* и *Vibrio alginolyticus* [1]. Одним из аналогичных продуцентов пептидазы M9 является *Aeromonas salmonicida* (локус – ASA_3723). Пептидаза M9 *Aeromonas salmonicida* имеет цинк-связывающий HEYVH мотив как у пептидазы *Vibrio* III класса и не содержит С-концевой последовательности как пептидаза *Vibrio* II класса [2,3]. Целью нашей работы являлось получение рекомбинантной пептидазы M9 *Aeromonas salmonicida* на основе *Pichia pastoris* для обработки мясного сырья с целью его умягчения. Были наработаны лабораторные количества рекомбинантной пептидазы и проведена тестовая оценка ферментативной активности: рекомбинантная пептидаза M9 *Aeromonas salmonicida* не была активна в отношении казеина, не расщепляла синтетический субстрат FALGPA (Sigma). Проявляла ферментативную активность в отношении желатина и растворенной формы нативного коллагена. Была проведена оценка активности в отношении синтетического субстрата – одной из последовательности коллагеновой цепи – «Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg» ($M_w=846,06$). Через час воздействия рекомбинантной пептидазой M9 концентрация субстрата снизилась на порядок. Воздействие на белки соединительной ткани подтверждали на мясных

модельных системах. Опытные образцы мясного сырья обрабатывали супернатантом от рекомбинантных клонов *Pichia pastoris*. В результате проведенной структурно-механической оценки (Warner-Bratzler) установлено, что, в среднем, максимальное напряжение резания термически обработанных опытных образцов уменьшилось на 20,1 % по сравнению с контролем. В результате проведенных гистологических исследований образцов мясного сырья установлено влияние полученного супернатанта на структуру соединительной ткани. Полученный фермент мог бы найти применение в пищевой промышленности для тендеризации мясного сырья с высоким содержанием коллагена.

Литтература:

Brazzelli M, Cruickshank M, Tassie E, McNamee P, Robertson C, Elders A, Fraser C, Hernandez R, Lawrie D, Ramsay C. Collagenase clostridium histolyticum for the treatment of Dupuytren's contracture: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, 2015, 19(90):1-202. DOI: 10.3310/hta19900.
Zhang, Y.Z., Ran, L.Y., Li, C.Y., Chen, X.L. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(18):6098-107. DOI: 10.1128/AEM.00883-15.
Bekhit A.A, Hopkins D.L, Geesink G, Bekhit A.A, Franks P. Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2014, 54(8):1012-31. DOI: 10.1080/10408398.2011.623247.

UDC 637.5.039

RECOMBINANT PEPTIDASE OF M9 FAMILY AS A PERSPECTIVE ENZYME FOR MEAT TENDERIZATION

M.Yu. Minaev, A.A. Makhova

V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, 26 Talalikhina street, Moscow, 109316, Russia
e-mail: aeremtsova@gmail.com

Recombinant peptidase M9 *Aeromonas salmonicida* was obtained on the basis of the yeast strain *Pichia pastoris*. The supernatant was used to evaluate the enzyme activity. Recombinant peptidase broke the peptide bond «Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg» (one of the collagen chains) and it didn't have non-specific protease activity.

Key words: meat tenderization, recombinant peptidase, M9 family peptidase

Of particular interest for studies of collagenase activity is the M9 metallopeptidase family (MEROPS database), from pathogenic microorganisms *Clostridium histolyticum* and *Vibrio alginolyticus* [1]. One of the producers of M9A subfamily peptidase is *Aeromonas salmonicida* (locus - ASA_3723). Peptidase M9 *Aeromonas salmonicida* has a zinc-binding HEYVH motif as in class III *Vibrio collagenase* and does not contain a C-terminal sequence like class II *Vibrio collagenase* [2,3]. The purpose of this research was production of recombinant metallopeptidase *Aeromonas salmonicida* by transformation *Pichia pastoris* for further meat tenderization. Laboratory amounts of recombinant peptidase were obtained and test evaluation of enzyme activity was performed. recombinant metallopeptidase *Aeromonas salmonicida* didn't cleave the peptide collagenase substrate «FALGPA» (Sigma), but cleaved the native gelatin and soluble collagen. Recombinant peptidase broke the peptide bond «Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg» (one of the collagen chains, ($M_w=846,06$)) and didn't have non-specific protease activity to casein. After an hour of exposure to recombinant peptidase M9, the substrate concentration decreased by an order of magnitude. The impact on connective tissue proteins was confirmed on meat model systems. Samples of raw meat were treated with supernatant from recombinant clones of *Pichia pastoris*. Warner-Bratzler shear force of enzyme and temperature treated meat samples was measured. Saline treated meat sample was as a control. Shear force of recombinant peptidase treated meat sample declined by 20,1%, compared with control meat sample. As a result of histological studies of samples of raw meat, the effect of the resulting supernatant on the structure of connective tissue was established. The resulting enzyme could be used in the food industry for the meat tenderization.

References:

1. Brazzelli M, Cruickshank M, Tassie E, McNamee P, Robertson C, Elders A, Fraser C, Hernandez R, Lawrie D, Ramsay C. Collagenase clostridium histolyticum for the treatment of Dupuytren's contracture: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, 2015, 19(90):1-202. DOI: 10.3310/hta19900.
2. Zhang, Y.Z., Ran, L.Y., Li, C.Y., Chen, X.L. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(18):6098-107. DOI: 10.1128/AEM.00883-15.
3. Bekhit A.A, Hopkins D.L, Geesink G, Bekhit A.A, Franks P. Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2014, 54(8):1012-31. DOI: 10.1080/10408398.2011.623247.

УДК: 57.083.12

СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБИОТЫ В РЕСПУБЛИКЕ СЕВЕРНАЯ ОСЕТИЯ-АЛАНИЯ

Цугкиев Б.Г., Соловьева Ю.В., Кабисов Р.Г., Хозиев А.М., Рамонова Э.В., Петрукович А.Г., Цугкиева В.Б.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Горский государственный аграрный университет», 362040, г. Владикавказ, ул. Кирова, 37.
 e-mail: Zugkiev@mail.ru

В тезисах представлены результаты изучения систематического разнообразия микробиоты в Республике Северная Осетия-Алания.

Ключевые слова: разнообразие микробиоты, селекция, микроорганизмы, штаммы

Изучение разнообразия молочнокислых микроорганизмов и выбор лучших из них может быть достигнуто в результате ряда комплексных исследований - изучение физиолого-биохимических свойств, геномная характеристика и технологические показатели выделяемых микроорганизмов [1].

Исследования, проведенные рядом авторов, свидетельствуют о том, что молочнокислые бактерии значительно распространены как в окружающей среде, так и в организме животных, в том числе и у диких зверей [2].

Материалом для получения чистых культур молочнокислых микроорганизмов служили образцы растений, отобранные в экологически чистой горной зоне Республики Северная Осетия-Алания, образцы содержимого пищеварительного тракта животных, а также айран домашнего приготовления.

Для выделения штаммов дрожжей использовали смывы с поверхности ягод разных сортов винограда и шишек дикорастущего хмеля, а также айран домашнего приготовления.

Принадлежность к тому или иному виду отобранных и изученных штаммов молочнокислых микроорганизмов производили по Л.А Банниковой [3], а идентификацию дрожжей осуществляли по И.П. Бабьевой и В.И. Голубеву [4].

Идентификация отобранных штаммов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и изучением гена 16S рДНК осуществлена в Биоресурсном Центре Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика.

В результате проведенных исследований выделено, идентифицировано и депонировано в Биоресурсном Центре Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика 14 штаммов микроорганизмов - 5 штаммов дрожжей и 9 штаммов бактерий, сбраживающих лактозу.

Одним из источников для выделения ряда молочнокислых микроорганизмов и дрожжей стал айран домашнего приготовления, из которого изолированы штаммы *Lactobacillus delbrueckii* ВКПМ В – 13108, *Streptococcus salivarius* ВКПМ В – 13056, и *Rhodotorula mucilaginosa* ВКПМ У – 4342.

Из соцветия клевера ползучего изолирован штамм *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-13052, а из соцветия клевера лугового - *Enterococcus canintestini* ВКПМ В-13053.

Из содержимого кишечника косули изолирован штамм *Enterococcus faecalis* ВКПМ В – 13049.

Штамм *Enterococcus mundtii* ВКПМ В-13057 изолирован из содержимого кишечника яка, обитающего в Дигорском ущелье РСО-Алания.

С поверхности ягод винограда сорта Каберне выделены штаммы *Metschnikowia pulcherrima* ВКПМ У – 4339 и *Pichia kluyveri* ВКПМ У – 4343, а из шишек дикорастущего хмеля – штаммы *Metschnikowia pulcherrima* ВКПМ У- 4340 и *Pichia kudriavzevii* ВКПМ У- 4341.

Из толстого кишечника подсосных телят изолированы штаммы *Enterococcus hirae* ВКПМ В – 13055, *Enterococcus durans* ВКПМ В -13058, *Enterococcus hirae* ВКПМ В – 13054.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о систематическом разнообразии микробиоты в Республике Северная Осетия-Алания, в том числе и в высокогорных, экологически чистых зонах. Выделенные нами штаммы молочнокислых микроорганизмов и дрожжей могут быть рекомендованы для включения в состав заквасок при производстве пробиотических продуктов, а также высокобелковых кормовых добавок.

Литература:

1. Ботина, С.Г. Видовая идентификация и паспортизация молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования / С.Г. Ботина // Молочная промышленность, 2008. - № 3. – С. 52.

2. Tsugkiev, B.G. et al. Breeding probiotic strains of microorganisms / B.G. Tsugkiev, E.V. Ramonova, R.G. Kabisov, A.G. Petrukovich, A.M. Hoziev, I.B. Tsugkueva // *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* (ISSN 2320-8694-India-WoS-Core Collection ESCI). April-2018. – Vol. 6(2). – Page 335-341.
3. Банникова, Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л.А. Банникова // М.: Пищевая промышленность. 1975. – 255 с.
4. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И.П. Бабьева. В.И. Голубев // М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.

УДК: 57.083.12

SYSTEMATIC VARIETY OF MICROBIOTA IN REPUBLIC OF NORTH OSSETIA -ALANIA

B.G. Tsugkiev, Y.V. Solovyova, R.G. Kabisov, R.G. Hoziev, E.V. Ramonova, A.G. Petrukovich, V.B. Tsugkueva

State Federal-Funded Educational Institution of Higher Professional Education "Gorsky State Agrarian University", bld. 37, Kirov str., Vladikavkaz, Russian Federation, 362040,
e-mail: Zugkiev@mail.ru

Results of studying the systematic variety of microbiota in Republic of North Ossetia -Alania are presented in abstract.

Key words: variety of microbiota, selection, microorganisms, strains

Studying the variety of lactic-acid microorganisms and selection of the best ones among them can be realised as a result of complex investigations, particularly the physiological, biochemical and genomic characteristics, as well technological parameters of isolated microorganisms [1].

Investigations done by the number of authors provide the evidence of vast localization of lactic-acid microorganisms both in environment and in the animals organisms inclusive wild beasts [2].

The following sources were used for isolation of pure strains of lactic-acid microorganisms, particularly plants gathered in a pollutant-free mountain area of Republic of North Ossetia -Alania, samples of the animals digestive tract content and as well home-made ayran.

For isolation of yeasts strains the swabs from surfaces of a variety of grape berries and wild hop cones as well home-made ayran were utilized.

Identification of isolated strains of lactic-acid microorganisms on the species level was done according to L.A. Bannikova method [3], and identification of yeasts was performed using I.P. Babyeva and V.I. Golubev method [4].

Identification of selected microorganisms strains by polymerase chain reaction (PCR) and 16S rDNA gene investigation were done in Bio-resource center of Russian National Collection of Industrial Microorganisms (BRC RNCIM) of Research Center 'Kurchatov Institute' - GosNIIgenetika.

As a results of investigations performed - 14 strains of microorganisms among them 5 strains of yeasts and 9 strains of lactose-fermenting bacteria were isolated, identified and deposited with Bio-resource center of Russian National Collection of Industrial Microorganisms (BRC RNCIM) of Research Center 'Kurchatov Institute' - GosNIIgenetika.

Home-made ayran as source for selection of lactic-acid microorganisms and yeasts had resulted in isolation of the following strains - *Lactobacillus delbrueckii* БКПМ В – 13108, *Streptococcus salivarius* БКПМ В – 13056 and *Rhodotorula mucilaginosa* БКПМ Y – 4342.

Strain *Lactobacillus plantarum* БКПМ В-13052 was isolated from the inflorescence of *Trifolium repens*, and *Enterococcus canintestini* БКПМ В-13053 - from the inflorescence of *Trifolium pratense*.

Strain *Enterococcus faecalis* БКПМ В – 13049 was isolated from the gastrointestinal contents of roe deer.

Strain *Enterococcus mundtii* БКПМ В-13057 was isolated from the gastrointestinal contents of yak inhabiting in Digorsky canon of Republic of North Ossetia -Alania.

Metschnikowia pulcherrima БКПМ Y – 4339 and *Pichia kluyveri* БКПМ Y – 4343 were isolated from the surface of Cabernet grape berries, and strains *Metschnikowia pulcherrima* БКПМ Y- 4340 and *Pichia kudriavzevii* БКПМ Y- 4341 were recieved from the wild hop cones.

Strains *Enterococcus hirae* БКПМ В – 13055, *Enterococcus durans* БКПМ В -13058, *Enterococcus hirae* БКПМ В – 13054 were isolated from large bowel of suckling calfs.

The investigations performed demonstrate the systematic variety of microbiota in Republic of North Ossetia -Alania including high-mountain and pollutant-free areas.

Strains of lactic-acid microorganisms and yeasts isolated by us can be recommended for inclusion in the composition of probiotic fermentation starters during their preparation and as well for manufacturing of supplement feeds with high-protein content.

References:

- Botina, S.G. Identification on Species Level and Certification of Lactic-Acid Bacteria via Methods of Molecular-Genetic Matching / S.G. Botina // *Milk Industry*, 2008. - No. 3. - Page. 52.
- Tsugkiev, B.G. et al. Breeding probiotic strains of microorganisms / B.G. Tsugkiev, E.V. Ramonova, R.G. Kabisov, A.G. Petrukovich, A.M. Hoziev, I.B. Tsugkueva // *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences (ISSN 2320-8694-India-WoS-Core Collection ESCI)*. April-2018. - Vol. 6(2). - Pages 335 - 341.
- Bannikova, L.A. Selection of Lactic-Acid Bacterias and Their Utilization in Milk Industry / L.A. Bannikova // *M.: Food Industry*. 1975. - Page 255.
- Babyeva, I.P. Methods of Yeasts Isolation and Identification / I.P. Babyeva, V.I. Golubev // *M.: Food Industry*, 1979. - Page 120.

УДК [594:637.56.03:664.959]:339.138(470.7)

СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД К КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ МОЛЛЮСКОВ И ПРОДВИЖЕНИЮ ПРОДУКЦИИ НА ИХ ОСНОВЕ (ПРОБЛЕМАТИКА РЕСПУБЛИКИ КРЫМ)

Битютская О. Е.¹, Багаева Т. Л.², Серёгин С. С.¹

¹Федеральный государственный бюджетный университет высшего образования «Керченский государственный морской технологический университет», Керчь, Россия

² независимый исследователь
e-mail: tatyanabahaeva@gmail.com

Авторы предложили применение системного подхода к комплексной переработке моллюсков с учетом взаимосвязанности составляющих элементов: сырьевой обеспеченности, экономики марикультуры, оценки технологических решений, возможной экологизации производства и с привлечением инструментария социологии брендинга при продвижении морепродуктов в конкурентной среде.

Ключевые слова: моллюски, комплексные малоотходные технологии, биотехнологические методы, биологически активные добавки, функциональные пищевые продукты, экономика марикультуры, социология брендинга

Усовершенствование и внедрение разработок комплексной глубокой переработки водных биоресурсов является актуальным и востребованным направлением развития рыбохозяйственной отрасли, санаторно-курортного комплекса и в целом Республики Крым как рекреационного региона [1-3]. Приоритетным направлением выбраны биотехнологические методы обработки сырья, позволяющие расширить ассортиментный ряд, создавать качественные и безопасные продукты, снизить их себестоимость, увеличить уровень потребления и тем самым стимулировать развитие пищевой промышленности.

Особое внимание уделено разработке новых биологически активных добавок и функциональных пищевых продуктов, которые используются в нутрициологии и вызывают особый интерес в силу выраженных лечебно-профилактических свойств. Так, комплексная малоотходная технология белково-углеводных концентратов из *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Rapana venosa* Valenciennes предусматривает рациональное использование моллюсков разных размерных групп, ферментативную обработку сырья с получением БАД, утилизацию отходов в виде кормовых добавок [4]. Введение в состав концентратов низкомолекулярных антиоксидантов растительного происхождения (экстрактов *Juglans regia* L., *Rosa cinnamomea* L., *Crataegus sanguinea* Pall.) позволило улучшить функциональные свойства и сенсорные характеристики БАД [5-7].

Системный подход, основанный на конвергенции методологий, предусматривающих использование инструментария социологии брендинга [8] предоставляет возможность построить обобщенную модель, позволяющую снизить концептуальные, конъюнктурные и организационные риски и выйти на следующие результаты:

1. Оценить перспективы развития сырьевой базы и выявить резервы роста инвестиционной привлекательности марихозяйств по выращиванию моллюсков; эффективность конхиокультуры в системе региональной экономики.

2. Обосновать выбор комплексной биотехнологии с получением широкого ассортимента пищевых продуктов, БАД, функциональных пищевых продуктов и ингредиентов, кормовых добавок.

3. Включить продвижение и коммуникацию в основной цикл разработки продукта. Это усилит сферу контроля и позволит отказаться от услуг маркетинговых компаний, которые не обладают специфическими знаниями о сферах рынка и потребления морепродуктов.

Литература:

1. Стратегия развития рыбного хозяйства Российской Федерации на период до 2030 года. URL: <http://fish.gov.ru/files/documents/files/proekt-strategiya-2030.pdf> (дата обращения 05.12.2018).
2. Губанов Е. П., Панов Б. Н., Битютская О. Е. Основные направления устойчивого развития рыбной промышленности Азово-Черноморского бассейна // Рыбное хозяйство. — 2015. — № 4. — С. 66-69.
3. Серёгин С. С. Анализ инвестиционной привлекательности районов выращивания морской аквакультуры Восточного Крыма // Экономика и управление: теория и практика. — 2018. — Т. 4, № 3. — С. 55-60.
4. Битютская О. Состав и биологические свойства добавки из мидий // Товары и рынки. — 2007. — № 2. — С. 81-92.
5. Битютская О. Е., Губанова А. Г. Способ получения диетических добавок из биополимеров мидий // Патент на полезную модель 72850 UA. 2012. Бюл. №16.
6. Битютская О. Е., Любчик В. Н., Овсянникова Т. Н. Использование моллюсков в технологии диетических продуктов // Товары и рынки. — 2012. — № 2. — С. 111-120.
7. Битютская О. Е., Овсянникова Т. В., Красова Н. С. Метаболическая ценность состава биополимеров из моллюсков // Известия КГТУ. — 2017. — № 44. — С. 89-98.
8. Багаева Т. Л. Брендинг в оптике социологии: монография. — К.: Академвидав, 2017. — 340 с.

UDC [594:637.56.03:664.959]:339.138(470.7)

SYSTEMIC APPROACH TO THE COMPREHENSIVE PROCESSING OF THE MOLLUSKS AND THE ADVANCEMENT OF THE PRODUCTS BASED ON THEM (ISSUES SPECIFIC TO THE CRIMEAN REPUBLIC)

Bityutskaya O. E.¹, Bahaeva T. L.², Seregin S. S.¹

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kerch State Maritime Technological University", Kerch, Russia

²Independent researcher
e-mail: olha98306@yandex.ru

The authors offer a systematic approach to the comprehensive processing of the mollusks, taking into account the interconnectedness of the composing elements: provision of the raw materials, economics of the marine culture, evaluation of the technological solutions, possible ecologization of the production and the involvement of branding instruments in the advancement of sea products in a competitive environment.

Key words: mollusks, comprehensive low-waste technologies, biotechnological methods, biologically active supplements, functional food products, economics of marine culture, branding

Improvement and introduction of the implementations in comprehensive, exhaustive processing of biological resources are currently in much demand in the areas of fish industry development, Crimean health resorts and the Crimean Republic as a recreational region [1-3]. The methods of raw materials processing were selected as the main theme as they provide for the expansion of the product assortment, increased quality and safety, reduction in processing costs and thus promote the advances in the food industry.

Special attention is paid to the development of bio-supplements and functional food products, which have occupied a prominent place in the nutritional science and attract much interest due to their well-known therapeutic and prophylactic benefits. In this respect, comprehensive low-waste production technology of the *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Rapana venosa Valenciennes* protein-carbohydrate concentrates involves economical use the mollusks belonging to different size groups, enzyme treatment of the raw materials resulting in BAD, utilization the by-products as animal feed supplements. Introduction of antioxidants of the plant origin to the composition of the concentrates (extractions of *Juglans regia* L., *Rosa cinnamomea* L., *Crataegus sanguinea* Pall.) provides for improvement in functional properties and sensor characteristics BAD.

Systemic approach, based on the convergence of the methodologies, that use the instruments of the branding sociology provides for the possibility of the development of a comprehensive model, which will reduce the conceptual, competitive and organizational risks and achievement of the following results:

1. Evaluate the prospect of the development of raw material base and determine the growth reserves of the investment attractiveness of marine farms that will raise mollusks; effectiveness of the konhioculture in the system of the regional economy.

2. Substantiation of the selection of comprehensive biotechnology resulting in the obtainment of a wide assortment of food products, BAD, functional food products, ingredients, and animal feed supplements.

3. Include promotion and communication in the main product development cycle. This will expand the scope of control & allow to abandon the services of marketing companies that lack specific expertise in market spheres and consumption of sea products.

References:

1. Strategiya razvitiya rybnogo hozyajstva Rossijskoj Federacii na period do 2030 goda. URL: <http://fish.gov.ru/files/documents/files/proekt-strategiya-2030.pdf> (data obrashcheniya 05.12.2018).
2. Gubanov E. P., Panov B. N., Bityutskaya O. E. Osnovnye napravleniya ustojchivogo razvitiya rybnoj promyshlennosti Azovo-Chernomorskogo bassejna // Rybnoe hozyajstvo. — 2015. — № 4. — S. 66-69.
3. Seryogin S. S. Analiz investicionnoj privlekatel'nosti rajonov vyrashchivaniya morskoy akvakul'tury Vostochnogo Kryma // Ehkonomika i upravlenie: teoriya i praktika. — 2018. — T. 4, № 3. — S. 55-60.
4. Bityutskaya O. Sostav i biologicheskie svoystva dobavki iz midij // Tovary i rynki. — 2007. — № 2. — S. 81-92.
5. Bityutskaya O. E., Gubanova A. G. Sposob polucheniya dieticheskikh dobavok iz biopolimerov midij // Patent na poleznuyu model' 72850 UA. 2012. Byul. №16.
6. Bityutskaya O. E., Lyubchik V. N., Ovsyannikova T. N. Ispol'zovanie mollyuskov v tekhnologii dieticheskikh produktov // Tovary i rynki. — 2012. — № 2. — S. 111-120.
7. Bityutskaya O. E., Ovsyannikova T. V., Krasova N. S. Metabolicheskaya cennost' sostava biopolimerov iz mollyuskov // Izvestiya KGTU. — 2017. — № 44. — S. 89-98.
8. Bahaeva T. L. Brending v optike sociologii: monografiya. — K.: Akademvidav, 2017. — 340 s.

УДК 663.15

СОЗДАНИЕ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ НАПИТКОВ С УЛУЧШЕННЫМИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ И ПОТРЕБИТЕЛЬСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Шаненко Е.Ф.¹, Николаев Ю.А.², Эль-Регистан Г.И.², Мухамеджанова Т.Г.¹, Рындин А.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», РФ, 125080, г. Москва, Волоколамское ш., 11

²ФИЦ Биотехнологии РАН, РФ, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.
e-mail: NikolaevYA@mail.ru

В работе описана технология создания напитков на основе овощного сырья, ферментированного молочнокислыми бактериями.

Ключевые слова: ферментированные напитки, молочнокислые бактерии, нейромедиаторы

В эпоху ухудшения среды обитания по физическим и химическим показателям, высокой интенсивности труда и плотных информационных потоков на первый план выходит задача облегчения или устранения стрессовой нагрузки на человека. Снизить стрессовые напряжения, хотя бы частично, может поступление в организм с пищей таких нейромедиаторов как, серотонин, дофамин и норадреналин или их предшественников – триптофана, тирозина и фенилаланина. Эти аминокислоты содержатся в зелёном чае, финиках, шоколаде, бананах, клубнике и других продуктах. Ещё одним источником поступления в организм нейромедиаторов являются ферментированные напитки и кисломолочные продукты. В работах отечественных и зарубежных исследователей показана способность некоторых молочнокислых микроорганизмов синтезировать нейромедиаторы. ^[1,2] Включение в рацион пищи кисломолочных продуктов, полученных с использованием продуцентов нейромедиаторов, позволит снять нервное напряжение и повысить работоспособность. Для людей с непереносимостью молока альтернативной формой могут быть ферментированные овощные и фруктовые соки.

Целью данного исследования было создание рецептуры и технологии ферментированного напитка, положительно влияющего на психоэмоциональное состояние человека и его работоспособность. При получении ферментированных напитков использовали заквасочные молочнокислые микроорганизмы, формирующие органолептические и функциональные свойства.

В качестве основы напитка было выбрано овощное сырьё, производимое в больших объемах на тер-

ритории РФ: морковь, свекла, тыква и топинамбур. Выбор обусловлен комплексом биологически активных веществ и их функциональными свойствами. Выбранные овощи содержат большое количество флавоноидов, замедляющих процессы старения и очищающих организм от свободных радикалов, а также β -каротин, аскорбиновую кислоту, пектин, бифидофакторы, витамины группы В, микро- и макроэлементы.

Ферментацию проводили, используя культуры молочнокислых микроорганизмов, применяемых в пищевой промышленности. Предварительно полученные результаты показали, что используемые штаммы *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus acidophilus* являются активными продуцентами серотонина и дофамина.

Подбор параметров ферментации, засевной дозы, температуры и длительности процесса, позволил получить напиток с хорошими органолептическими свойствами.

В качестве подсластителя напитка был использован гидролизат клубней топинамбура, который был получен путём неполного гидролиза биомассы клубней собственными инулиназами.

Определены параметры процесса гидролиза, позволяющие получить высокое содержание фруктоолигосахаридов (ФОС), активирующих рост бифидобактерий. Функциональные свойства гидролизата топинамбура подтверждены результатами клинических испытаний, и он рекомендован для включения в рацион больных сахарным диабетом. Для обогащения аминокислотами тирозином и триптофаном в напиток дополнительно вводили экстракт зелёного чая.

Для стабилизации микроорганизмов использовали специальные методы, позволяющие увеличить срок хранения напитка, содержащего живые клетки бактерий-пробиотиков в необходимом высоком титре, до 10 месяцев. Получено заключение о безопасности созданного продукта.

Работа выполнена по госзаданию ГЗ № 0104-2019-0005.

Литература:

1. Жиленкова О.Г., Шендеров Б.А., Клодт П.М., Кудрин В.С., Олескин А.В. Молочные продукты как потенциальный источник соединений, модифицирующих поведение потребителей // *Молочная промышленность*. 2013. №10.
2. Олескин А.В., Жиленкова О.Г., Шендеров Б.А., Амерханова А.М., Кудрин В.С., Клодт П.М. Заквасочные культуры лактобацилл - продуценты нейромедиаторов: биогенных аминов и аминокислот // *Молочная промышленность*. 2014. № 9. С. 42-43.

UDC 663.15

CREATION OF FERMENTED BEVERAGES WITH IMPROVED TECHNOLOGICAL AND CONSUMER PROPERTIES

Shanenko E.F.¹, Nikolaev Yu.A.², El-Registan G.I.², Mukhamedzhanova T.G.¹, Ryndin A.A.¹

¹FRC for Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 119071, Moscow, Leninsky Prospect, 33, Building 2

²FSBEI of HE "Moscow State University of Food Production", Russian Federation, 125080, Moscow, Volokolamskoe highway, 11

e-mail: NikolaevYA@mail.ru

The paper describes the technology of creating beverages based on vegetable raw materials fermented by lactic acid bacteria.

Key words: Stress, neurotransmitters, drinks, lactic acid bacteria

In the era of intensive technologies and dense information flows, the task of reducing stress load comes to the fore.

Reducing stress, at least partially, can be ingested with food from such neurotransmitters as serotonin, dopamine and noradrenaline, or their predecessors - tryptophan, tyrosine and phenylalanine. These amino acids are found in green tea, dates, chocolate, bananas, strawberries and other products. Another source of intake of neurotransmitters are fermented beverages and dairy products.

In the works of domestic and foreign researchers demonstrated the ability of some lactic acid microorganisms to synthesize neurotransmitters. [1,2] Inclusion in the diet of food fermented milk products obtained with the use of producers of neurotransmitters, will help relieve nervous tension and increase efficiency. For people with milk intolerance, fermented vegetable and fruit juices can be an alternative form.

The purpose of this study was to create a formulation and technology of a fermented drink that positively affects the psycho-emotional state of a person and his performance.

When producing fermented beverages, starter lactic acid microorganisms were used, forming organoleptic and

functional properties.

In the process of fermentation, microorganisms enrich the medium with various organic acids and other metabolites. In addition, lactic acid bacteria have antagonistic activity against pathogenic microorganisms.

Vegetable raw materials, produced in large volumes on the territory of the Russian Federation: carrot, beet, pumpkin and Jerusalem artichoke were chosen as the basis of the drink. The choice is due to the complex of biologically active substances and their functional properties. Selected vegetables contain a large amount of flavonoids, which slow down the aging process and cleanse the body of free radicals, as well as β -carotene, ascorbic acid, pectin, bifidofactors, B vitamins, micro- and macroelements.

Fermentation was carried out using cultures of lactic acid microorganisms used in the food industry.

Previously obtained results showed that the used strains of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus acidophilus* are active producers of serotonin and dopamine.

The selection of fermentation parameters: seeding dose, temperature and duration of the process, allowed us to obtain a drink with good organoleptic properties.

As a sweetener of the drink, the hydrolyzate of Jerusalem artichoke tubers was used, which was obtained by incomplete hydrolysis of the biomass of tubers with its own inulinases.

The parameters of the hydrolysis process have been determined, which make it possible to obtain a high content of fructooligosaccharides (OPC), activating the growth of bifidobacteria. The functional properties of the Jerusalem artichoke hydrolyzate are confirmed by the results of clinical trials, and it is recommended for inclusion in the diet of diabetic patients. To enrich the amino acids tyrosine and tryptophan, green tea extract was additionally introduced into the drink.

To stabilize microorganisms, special methods were used to increase the shelf life of a drink containing live cells of probiotic bacteria in the required high titer, up to 10 months.

The work was supported by State task № 0104-2019-0005.

References:

1. Zhilenkova O.G., Shenderov B.A., Klodt P.M., Kudrin V.S., Oleskin A.V. Dairy products as a potential source of compounds that modify the behavior of consumers // *Dairy industry*. 2013. №10.
2. Oleskin A.V., Zhilenkova O.G., Shenderov B.A., Amerkhanova A.M., Kudrin V.S., Klodt P.M. *Lactobacillus* starter cultures - producers of neurotransmitters: biogenic amines and amino acids // *Dairy industry*. 2014. No. 9. P. 42-43.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77

СТРУКТУРНЫЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕНООБРАЗУЮЩИХ СПОСОБНОСТЕЙ КОМПЛЕКСА КАЗЕИНАТА НАТРИЯ С ЛИПОСОМАМИ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА, НАПОЛНЕННЫМИ ОМЕГА-3 α -ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Самусева Ю. В.¹, Гуреева М. Д.¹, Чеботарёв С. А.¹, Зеликина Д. В.², Makasa Akwebiwa J.¹, Антипова А.С.², Мартиросова Е. И.², Семёнова М.Г.².

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия. 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия. 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4.
e-mail: acell167@gmail.com

Представлен структурный и термодинамический анализ пенообразующих способностей комплекса основного белка молока – казеината натрия с липосомами фосфатидилхолина (ФХ), наполненными незаменимой омега-3 альфа-линоленовой кислотой (АЛК).

Ключевые слова: казеинат натрия, структурные параметры, термодинамическое сродство к водной среде, липосомы фосфатидилхолина, омега-3 альфа-линоленовая кислота, супрамолекулярный комплекс, пенообразующие способности

Водорастворимый комплекс казеината натрия с, предварительно приготовленными гомогенизацией (механической и ультразвуковой) с последующей экструзией (через мембранный фильтр с диаметром пор 100 нм), липосомами ФХ, наполненными АЛК, формировался самопроизвольно при смешении компонен-

тов в шейкер-инкубаторе при 40 °C в течение 1 часа [1]. Структурные (молярная масса, размер, архитектура, плотность, дзета-потенциал) и термодинамические (осмотический второй вириальный коэффициент, характеризующий термодинамическое сродство к водной среде) параметры супрамолекулярного комплекса были охарактеризованы методом лазерного светорассеяния в статическом, динамическом и электрофоретическом режимах [2]. Пенообразующую способность супрамолекулярного комплекса определяли по таким свойствам и параметрам пены, как (1) дисперсность; (2) высота пены; (3) скорость перехода в пену одинакового объёма раствора образца при постоянной скорости подачи воздуха (метод барбатирования); (4) скорость дренажа водной среды из пены и (5) время полураспада пены. В данном исследовании проведено сравнение пенообразующих способностей сформированного супрамолекулярного комплекса и его отдельных компонентов, а именно казеината натрия и липосом ФХ, наполненных АЛК. Установлена определяющая роль в пенообразующей способности супрамолекулярного комплекса как его термодинамического сродства к растворителю, так и степени ассоциации в нём белка. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

Литература:

1. Semenova M.G., Antipova A.S., Belyakova L.E., Polikarpov Yu N., Anokhina M.S., Grigorovich N.V., Moiseenko D.V. Structural and thermodynamic properties underlying the novel functionality of sodium caseinate as delivery nanovehicle for biologically active lipids// *Food Hydrocolloids*. - 2014. - 42. - P. 149-161.
2. Burchard. W. Light scattering// *Physical techniques for the study of food biopolymers*. -1994). - P. 151-214.

UDK 544.3.03: 544.032: 544.77

STRUCTURAL AND THERMODYNAMIC ANALYSIS OF THE FOAMING ABILITIES OF THE COMPLEX OF SODIUM CASEINATE WITH LIPOSOMES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LOADED WITH OMEGA-3 α -LINOLENIC ACID.

Samuseva Y.V.¹, Gureeva M. D.¹, Chebotarev S. A.¹, Zelikina D. V.², Makasa Akwebiwa J.¹, Antipova A. S.², Martirosova E. I.², Semenova M. G.²

¹ D. I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
125047 Moscow, Miusskaya sq., 9

² N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. 119334 Moscow, Kosygin str., 4.
e-mail: accell167@gmail.com

This work presents the structural and thermodynamic analysis of the foaming abilities of the complex of the major milk protein (sodium caseinate) with liposomes of phosphatidylcholine (PC) loaded with the essential omega-3 alpha linolenic acid (ALA).

Key words: sodium caseinate, structural parameters, thermodynamic affinity for aqueous medium, liposomes of phosphatidylcholine, omega-3 alpha linolenic acid, supramolecular complex, foaming capacities

A water-soluble complex has formed spontaneously between sodium caseinate and preliminary prepared by sequential homogenization (both mechanical and ultrasound) followed by extrusion (through the membrane filter with a diameter of pores of 100 nm) PC liposomes loaded with ALA under mixing of their solutions. This mixing has been performed at 40 °C in the shaker-incubator for 1 hour [1]. Structural (molar mass, size, architecture, density, zeta-potential) and thermodynamic (the osmotic second virial coefficient reflecting the thermodynamic affinity for aqueous medium) parameters of the supramolecular complex have been characterized by a laser light scattering method in static, dynamic and electrophoretic modes [2]. The foaming ability of the supramolecular complex has been determined by the following both properties and parameters of the foams: (1) the dispersity; (2) the height; (3) the velocity of foaming of the same volume of the sample solutions at a constant rate of the air supply (a bubbling method); (4) the velocity of the drainage of aqueous medium from the foams and (5) the foam half-life time. A comparison has been carried out in this study of foaming abilities of the formed supramolecular complex and its individual components, namely sodium caseinate and PC liposomes loaded with ALA. The major roles in the foaming ability of both the thermodynamic affinity of the complex for aqueous medium and the extent of the protein association in the complex have been elucidated. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 18-316-00111.

References:

1. Semenova M.G., Antipova A.S., Belyakova L.E., Polikarpov Yu N., Anokhina M.S., Grigorovich N.V., Moiseenko D.V. Structural and thermodynamic properties underlying the novel functionality of sodium caseinate as delivery nanovehicle for biologically active lipids// *Food Hydrocolloids*. - 2014. - 42. - P. 149-161.
2. Burchard. W. Light scattering// *Physical techniques for the study of food biopolymers*. -1994). - P. 151-214.

УДК 544.3.03:544.032: 544.77

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПИЩЕВЫЕ ИНГРЕДИЕНТЫ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ И ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ: СТРУКТУРА И СВОЙСТВА.

Зеликина Д.В., Антипова А.С., Мартиросова Е.И., Пальмина Н.П., Мишарина Т.А, Семёнова М.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля Российской академии наук. Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4.
e-mail: dusman.05@mail.ru

Продemonстрирована роль структуры эссенциальных (незаменимых) липидов и пищевых биополимеров в конструировании пищевых ингредиентов с заданным для функциональных продуктов питания набором свойств.

Ключевые слова: физиологически-функциональные пищевые ингредиенты, эссенциальные липиды, пищевые биополимеры, структура, функциональные свойства

Данная работа демонстрирует примеры влияния структуры и молекулярной организации липосом и мицелл эссенциального фосфолипида (фосфатидилхолина сои в его нативной и лизо-формах), обогащённых омега-3 альфа линоленовой кислотой (индивидуально и в составе триглицеридов льняного масла) в отсутствии и в присутствии растительного антиоксиданта (эфирного масла гвоздики) на структуру и функциональные свойства их супрамолекулярных комплексов с пищевыми биополимерами (ковалентным конъюгатом казеината натрия и мальтодекстрина) [1, 2]. Комбинацией методов статического, динамического и электрофоретического лазерного светорассеяния, а также электронной парамагнитной спектроскопии и атомно силовой микроскопии, были установлены основные взаимосвязи между структурными параметрами (размер, молярная масса, архитектура, заряд, плотность, структурная организация липидных слоёв липосом и мицелл фосфолипидов) и такими функциональными свойствами изученных супрамолекулярных комплексов, как степень инкапсулирования эссенциальных липидов биополимерами, уровень растворимости в водной среде, защита эссенциальных липидов от окисления кислородом воздуха и обеспечение их биодоступности в условиях желудочно-кишечного тракта *in vitro*. На основании полученной структурной информации предложены 3-D модели супрамолекулярных комплексов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

Литература:

1. Semenova, M. G., Zelikina, D. V., Antipova, A. S., Martirosova, E. I., Grigorovich, N. V., Obushaeva, R. A., Shumilina, E. A., Ozerova, N. S., Palmina, N. P., Maltseva, E. L. V. V. Kasparov, N. G. Bogdanova, A. V., Krivandin. Impact of the structure of polyunsaturated soy phospholipids on the structural parameters and functionality of their complexes with covalent conjugates combining sodium caseinate with maltodextrins. // *Food Hydrocolloids*. – 2016. – 52. – P. 144 – 162.
2. A.S. Antipova, D.V. Zelikina, E.A. Shumilina, K.A. Baeva, M.G. Semenova. Sequential transformation of the structural and thermodynamic parameters of the complex particles, combining covalent conjugates (sodium caseinate + maltodextrin) with polyunsaturated lipids stabilized by a plant antiooxidant, in the simulated gastro-intestinal conditions *in vitro* // *Food Research International*. – 2016. – 88. – P.173–178.

UDK 544.3.03:544.032: 544.77

PHYSIOLOGICALLY FUNCTIONAL FOOD INGREDIENTS BASED ON BIOPOLYMERS AND ESSENTIAL LIPIDS: STRUCTURE AND PROPERTIES.

Zelikina D.V., Antipova A.S., Martirosova E.I., Palmina N.P., Misharina T.A., 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 role has been shown of the structure of both the essential lipids and food-grade biopolymers in the design of food ingredients having the defined series of properties that was important for functional food.

Key words: physiologically functional food ingredients, essential lipids, food-grade biopolymers, structure, functional properties

This work demonstrates examples of the influence of the structure and molecular arrangement of both the liposomes and micelles of the essential phospholipid (phosphatidylcholine in its native or lyso- forms) fortified with omega-3 alpha-linolenic acid (both individual and in the content of linseed oil triacylglycerols) in the presence or absence of a plant antioxidant (essential oil of clove bud) on both the structure and functional properties of their supramolecular complexes with food-grade biopolymers (covalent conjugate of sodium caseinate with maltodextrin) [1, 2]. Using the data obtained by such methods as static, dynamic and electrophoretic light scattering as well as by both the electron spin resonance spectroscopy and the atomic force microscopy, the main relationships have been elucidated between the structural parameters (size, molar mass, architecture, charge, density, structural arrangement of the lipid layers of both liposomes and micelles) and such functional properties of the considered supramolecular complexes as the encapsulation ability, solubility in water, protection of the essential lipids against oxidation and bioavailability of the lipids in the gastrointestinal tract *in vitro*. 3-D models of the supramolecular complexes have been suggested based on the structural information obtained.

This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 18-316-00111.

References:

1. Semenova, M. G., Zelikina, D. V., Antipova, A. S., Martirosova, E. I., Grigorovich, N. V., Obushaeva, R. A., Shumilina, E. A., Ozerova, N. S., Palmina, N. P., Maltseva, E. L. V. V. Kasparov, N. G. Bogdanova, A. V., Krivandin. Impact of the structure of polyunsaturated soy phospholipids on the structural parameters and functionality of their complexes with covalent conjugates combining sodium caseinate with maltodextrins. // Food Hydrocolloids. – 2016. – 52. – P. 144 – 162.
2. A.S. Antipova, D.V. Zelikina, E.A. Shumilina, K.A. Baeva, M.G. Semenova. Sequential transformation of the structural and thermodynamic parameters of the complex particles, combining covalent conjugates (sodium caseinate + maltodextrin) with polyunsaturated lipids stabilized by a plant antioxidant, in the simulated gastro-intestinal conditions *in vitro* // Food Research International. – 2016. – 88. – P.173–178.

УДК 663.5

ЦИФРОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Шелехова Н.В., Абрамова И.М., Серба Е.М., Шелехова Т.М., Скворцова Л.И., Полтавская Н.В., Легейдо Ю.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи питания и биотехнологии, Москва, Россия
111033, г. Москва, ул. Самокатная, дом 4б
e-mail: 4953624495@mail.ru

Построена модель автоматизированной системы управления технологическими процессами производства алкогольной продукции с использованием экспертной системы, основанной на принципах искусственного интеллекта. Предложены новые научно - технические решения в части разработки интеллектуальных систем автоматизации контроля технологических процессов производства.

Ключевые слова: алкогольная продукция, искусственный интеллект, киберфизические системы, технологические процессы, цифровые технологии

Цифровая трансформация промышленных предприятий вызывает рост общего объема неструктурированной информации за счет автоматически генерируемых данных. Важно отметить, что ранее большие данные (Big Data) не представляли особого интереса, так как для их обработки требовались значительные вычислительные мощности, а так же инструменты для анализа и структурирования[1].

В настоящее время для обработки массивов неструктурированной информации широко используется кластеризация, которая является эффективным инструментом для классификации[2]. Статистическая обработка больших данных позволит преобразовать неструктурированную информацию в знания, что обеспечит более эффективное принятие обоснованных управленческих решений, тем самым, увеличив производительность технологических процессов. Реализация предложенного подхода позволяет построить качественно новую систему в концепции цифрового производства.

Анализ научных подходов к управлению технологическими процессами производства алкогольной продукции показал, что разработка интеллектуальных систем поддержки принятия управленческих решений, основанных на применении искусственного интеллекта, является важной и актуальной задачей.

В результате проведенных исследований построена концептуальная модель автоматизированной системы управления технологическими процессами производства алкогольной продукции с использованием экспертной системы, основанной на принципах искусственного интеллекта. Основными задачами системы являются: мониторинг, проектирование, прогнозирование, управление, оптимизация процесса производства алкогольной продукции. Следует подчеркнуть, что интеллектуальная экспертная система может применяться для генерирования новых знаний в области биотехнологий[3-5]. Важным элементом автоматизированной системы является база знаний, предназначенная для хранения набора правил выбора соответствующих моделей и методов принятия решений. Информационное наполнение базы знаний позволит аккумулировать в электронной базе данных опыт и знания экспертов по ведению технологических процессов производства алкогольной продукции.

Очевидно, что перспективой развития настоящей тематики станут фундаментальные и прикладные научные исследования в области концепции цифрового производства и внедрения парадигмы промышленного интернета вещей (IIoT), где все поступающие с производства показания различных датчиков и информация, полученная с применением аналитического оборудования, объединяются в информационную сеть.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019-2021 годы (тема № 0529-2019-0066).

Литература:

1. Шелехова, Н.В. Информационные технологии в аналитическом контроле качества алкогольной продукции/Н.В. Шелехова, В.А. Поляков, Е.М. Серба, Т.М. Шелехова, О.В. Веселовская, Л.И. Скворцова//Пищевая промышленность.-2018. -№8.- С.- 30-33.
2. Дударин, П.В. Подход к кластеризации коротких текстовых фрагментов по иерархическому классификатору/ П.В. Дударин, Н.Г. Ярушкина// В сб.: Нечеткие системы и мягкие вычисления. Промышленные применения материалы Первой всеросс. научно-пр. конференции. -2017. -С. -367-375.
3. Шелехова, Н.В. Управление технологическими процессами производства алкогольной продукции с применением информационных технологий/Н.В. Шелехова, Л.В. Римарева //Хранение и переработка сельхозсырья.-2017. - №3.- С-28-31.
4. Шелехова Н.В., Разработка комплекса программ для автоматизации процесса обработки данных/ Н.В. Шелехова, В.А.Поляков, Е.М.Серба, Т.М.Шелехова, Н.В. Полтавская // Вопросы питания.-2018.-№5С.-С.-202-203.
5. Шелехова, Н.В. Внутривлабораторный контроль качества измерений с применением с применением ИТ-технологий/ Н.В. Шелехова, В.А. Поляков, Е.М. Серба, Т.М. Шелехова, Н.В. Полтавская //Пищевая промышленность-2018. -№10.- С.- 70-73.

UDC 663.5

DIGITAL TECHNOLOGIES IN THE FOOD INDUSTRY

Shelekhova N. V., Abramova I. M., Serba E. M., Shelekhova T. M., Skvortsova L. I., Poltavskaya N. V., Legeido U.V.

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, Moscow, Russia
111033, Moscow, Samokatnaya, 4b
e-mail: 4953624495@mail.ru

Engineered the model of the automated control system of technological processes of production of alcoholic beverages using an expert system based on the principles of artificial intelligence. New scientific and technical

solutions for the development of intelligent automation systems for control of production processes are proposed.

Key words: alcohol products, artificial intelligence, cyber-physical systems, technological processes, digital technologies

Digital transformation of industrial enterprises causes the growth of the total amount of unstructured information due to automatically generated data. It is important to note that previously Big Data were not of much interest, as their processing required significant computing power, as well as tools for analysis and structuring[1].

Cluster analysis- is an effective tool for classification, is widely used for processing arrays of unstructured information[2]. Statistical processing of big data will allow to transform unstructured information into knowledge, which will provide more effective decision-making, thus increasing the productivity of technological processes. Implementation of the proposed approach allows to build a qualitatively new system in the concept of digital production.

Analysis of scientific approaches to the management of technological processes of alcohol production showed that the development of intelligent systems to support management decision-making based on the use of artificial intelligence is an important and urgent task.

As a result of the research generated the conceptual model of the automated control system of technological processes of production of alcoholic beverages using an expert system based on the principles of artificial intelligence. The main objectives of the system are: monitoring, forecasting, management, optimization of the process of production of alcoholic beverages. It should be emphasized that the intelligent expert system can be used to generate new knowledge in the field of biotechnology[3-5]. An important element of the automated system is a knowledge base designed to store a set of rules for the selection of appropriate models and methods of decision-making. The information content of the knowledge base will allow to accumulate in the electronic database the experience and knowledge of experts in the conduct of technological processes of production of alcoholic beverages.

It is obvious that the prospect of the development of this topic will be fundamental and applied research in the field of digital production concept and the introduction of the industrial Internet of things (IIoT) paradigm, where all incoming from production readings of various sensors and information obtained with the use of analytical equipment are combined into an information network.

The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2019-2021 (project no. 0529-2019-0066).

References:

1. Shelekhova, N.V. *Informacionnye tekhnologii v analiticheskoy kontrolye kachestva alkogol'noj produkcii*/N.V. Shelekhova, V.A. Polyakov, E.M. Serba, T.M. Shelekhova, O.V. Veselovskaya, L.I. Skvorcova//*Pishchevaya promyshlennost'*.-2018. -№8. - S. - 30-33.
2. Dudarin, P.V. *Podhod k klasterizatsii korotkih tekstovykh fragmentov po ierarhicheskomu klassifikatoru*/ P.V. Dudarin, N.G. Yarushkina// *V sb.: Nechetkie sistemy i myagkie vychisleniya. Promyshlennye primeneniya materialy Pervoy vsereoss. nauchno-pr. konferentsii.* -2017. -S. -367-375.
3. Shelekhova, N.V. *Upravlenie tekhnologicheskimi processami proizvodstva alkogol'noj produkcii s primeneniem informatsionnykh tekhnologiy* / N.V. Shelekhova, L.V. Rimareva // *Hranenie i pererabotka sel'hozsyr'ya.* -2017. - №3. - S-28-31.
4. Shelekhova N.V., *Razrabotka kompleksa programm dlya avtomatizatsii processa obrabotki dannykh*/ N.V. Shelekhova, V.A.Polyakov, E.M.Serba, T.M.Shelekhova, N.V. Poltavskaya // *Voprosy pitaniya.*-2018.-№5S.-C.-202-203.
5. Shelekhova, N.V. *Vnutrilaboratornyy kontrol' kachestva izmereniy s primeneniem IT-tehnologiy*/ N.V. Shelekhova, V.A. Polyakov, E.M. Serba, T.M. Shelekhova, N.V. Poltavskaya // *Pishchevaya promyshlennost'*-2018. -№10. - S.- 70-73.

УДК 577.1; 577.1.08

ЭКСПРЕССНЫЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФИКОТОКСИНА МИКРОЦИСТИНА-LR В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33
e-mail: zvereva@yandex.ru

Разработана иммунохроматографическая тест-система для детекции фикотоксина микроцистина-LR в продуктах питания. Тест-система апробирована для контроля контаминации рыбной пищевой продукции.

Ключевые слова: фикотоксины, микрофистин, иммунохроматография, продукты питания

Иммунохроматографический анализ (ИХА) – удобное средство контроля присутствия токсичных контаминантов в продуктах питания вследствие экспрессности и простоты тестирования. Одним из важных токсикантов при мониторинге безопасности пищевых продуктов является микроцистин-LR. Микроцистины представляют собой группу циклических гептапептидов, которые продуцируются цианобактериями родов *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*. Наиболее распространен и опасен микроцистин-LR, который, попадая в организм человека через пищевую цепь, серьезно поражает печень.

Проведенная разработка ИХА микроцистина-LR включала синтез и характеристику конъюгатов специфических антител с коллоидным золотом, выбор условий иммобилизации иммунореагентов на мембранах тест-полоски и условий тестирования. Показано, что при проведении ИХА возможно как прямое, так и непрямое введение маркера в иммунные комплексы. Тест-системы позволяют детектировать микроцистин-LR с высокой чувствительностью (пределы обнаружения визуальной и приборной детекции 10 и 2 нг/мл, соответственно) при продолжительности анализа 15 минут. Разработанный ИХА микроцистина-LR был применен для характеристики контаминации рыбной пищевой продукции. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности ИХА для контроля фикотоксинов.

Работа выполнена по комплексному плану научных исследований «Приоритетные научные исследования в области питания населения».

UDK 577.1; 577.1.08

RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TESTS FOR DETERMINATION OF PHYCOTOXIN MICROCYSTIN-LR CONTENT IN FOOD PRODUCTS

Zvereva E.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

An immunochromatographic test system for the detection of phycotoxin microcystin-LR in food has been developed. The test system has been tested to control contamination of fish food products.

Key words: phycotoxins, microcystin-LR, immunochromatography, food

Immunochromatographic analysis (ICA) is a convenient method of controlling the presence of toxic contaminants in food products due to its rapidity and simplicity of testing. One of the important toxicants for food safety monitoring is microcystin-LR. Microcystins are a group of cyclic heptapeptides that are produced by cyanobacteria of genera *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*. The most widespread and dangerous compound among them is microcystin-LR. Entering the human body through the food chain, it seriously affects the liver.

The implemented development of ICA for the microcystin-LR included the synthesis and characterization of conjugates between specific antibodies and colloidal gold, the choice of regimes for immobilization of immunoreagents on the test strip membranes and testing conditions. It has been shown that both direct and indirect introduction of the gold marker into the detectable immune complexes could be used for the given ICA. The test systems allow the detection of microcystin-LR with high sensitivity (limits of visual and instrumental detection are 10 and 2 ng/mL, respectively) for a duration of 15 minutes. The developed was used to characterize the contamination of fish food products by the microcystin-LR. The obtained results indicate the promising use of ICA to control phycotoxins.

The work was carried out according to the comprehensive research plan «Priority researches in the field of nutrition of the population».

УДК 57.083.3

ЭКСПРЕССНЫЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТОКСИЧНЫХ КОНТАМИНАНТ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ И ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ: РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СКРИНИНГОВЫХ ТЕСТОВ

Жердев А.В., Зверева Е.А., Урусов А.Е., 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

Представлены методические решения по повышению чувствительности, производительности и информативности скринингового контроля пищевой и сельскохозяйственной продукции с использованием иммунохроматографических тест-систем. Эффективность предложенных подходов подтверждена на примерах детекции ветеринарных препаратов, регуляторов роста животных, пестицидов, микотоксинов.

Ключевые слова: тест-полоски, иммуноанализ, пищевая безопасность, токсичные контаминанты

В контроле пищевой безопасности иммунохроматографические тесты традиционно рассматриваются как средство предварительного скрининга, обеспечивающее быстрое и простое недорогое массовое тестирование, но уступающее методам подтверждающего лабораторного анализа в чувствительности и достоверности [1]. Такое распределение функций в двухуровневом контроле отражает базовые возможности методов. Однако модификация стандартных тестов позволяет существенно повысить чувствительность, производительность и информативность осуществляемого с их помощью анализа, не усложняя проведение тестирования [2,3]. В сообщении представлены результаты таких разработок для контроля приоритетных групп контролируемых токсичных контаминант сельскохозяйственной и пищевой продукции – ветеринарных препаратов, регуляторов роста животных, пестицидов, микотоксинов.

Рассмотрены способы управления последовательностью взаимодействий иммунореагентов на тест-полоске посредством изменения их взаимного расположения и среды нанесения. Показано, что варьирование состава конъюгатов наночастица-антитело позволяет сдвигать рабочий диапазон анализа на 1-2 порядка [4]. Охарактеризованы преимущества непрямого мечения специфических иммунных комплексов с помощью конъюгатов антитело-связывающих реагентов с наночастицами [5]. Рассмотрены варианты реализации мультиплексного анализа для одновременного контроля нескольких контаминант / групп контаминант. Проведена характеристика возможностей применения иммунохроматографических тест-систем с видеоцифровой регистрацией для количественной оценки содержания аналитов [3,6,7]. Разработанные тест-системы адаптированы для экспрессного (не более 20-25 мин., включая пробоподготовку) контроля токсичных контаминант в молоке и молочных продуктах, мясе и мясопродуктах, зерновой сельскохозяйственной продукции [6,7].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-53-18013).

Литература:

1. Dzantiev B. B., Byzova N. A., Urusov A. E., Zherdev A. V. Immunochromatographic methods in food analysis // *Trends in Anal. Chem.* 2014. Vol. 55. P. 81-93.
2. Shan S., Lai W., Xiong Y., Wei H., Xu H. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens // *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63. № 3. P. 745–753.
3. Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Ways to reach lower detection limits in lateral flow immunoassays // Chapter 2. In: *Rapid Test – Advances in Design, Format and Diagnostic Applications* (Ed. L. Anfossi). London: InTechOpen, 2018. P. 9-43.
4. Zvereva E. A., Byzova N. A., Sveshnikov P. G., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Cut-off on demand: Adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol // *Anal. Methods.* 2015. Vol. 7. P. 6378-6384.
5. Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Use of gold nanoparticle-labeled secondary antibodies to improve the sensitivity of an immunochromatographic assay for aflatoxin B1 // *Microchim. Acta.* 2014. Vol. 181. № 15-16. P. 1939-1946.
6. Hendrickson O. D., Zvereva E. A., Shanin I. A., Tarannum N., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. A lateral flow immunoassay for simultaneous determination of antibiotics in dairy products // *J. Food: Microbiol., Safety & Hygiene.* 2018. Vol. 3. P. 63.
7. Urusov A. E., Gubaidullina M. K., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Efficient rapid immunochemical tests for mycotoxins detection in foods // *J. Food: Microbiol., Safety & Hygiene.* 2018. Vol. 3. P. 75.

UDC 57.083.3

RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC CONTROL OF TOXIC CONTAMINANTS IN AGRICULTURAL AND FOOD PRODUCTS: EXTENDED OPPORTUNITIES OF SCREENING TESTS

Zherdev A.V., Zvereva E.A., Urusov A.E., 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: zherdev@inbi.ras.ru

Approaches to improve the sensitivity, performance and informativeness of screening control of food and agricultural products using immunochromatographic test systems are presented. The effectiveness of these approaches is confirmed by the examples of the detection of veterinary drugs, animal growth regulators, pesticides, mycotoxins.

Key words: test strips, immunoassay, food safety, toxic contaminants

In food safety control, immunochromatographic tests are commonly considered as a tool for preliminary screening that provides quick and easy, inexpensive wide testing, but is inferior to methods of confirmatory laboratory analysis in sensitivity and reliability [1]. This difference of functions in two-level control reflects the basic capabilities of the methods. However, the modification of standard tests can significantly increase their sensitivity, performance and information content without complicating the testing [2,3]. The report presents the results of such developments to control priority groups of controlled toxic contaminants of agricultural and food products, namely veterinary drugs, regulators of animal growth, pesticides, mycotoxins.

Ways to control the sequence of interactions between immunoreagents by changing their relative position on the test strip and media of application are considered. It was shown that varying the composition of the nanoparticle-antibody conjugates allows the working range of the analysis to be shifted by 1-2 orders of magnitude [4]. The advantages of indirect labeling of specific immune complexes with the help of conjugates of antibody-binding reagents with nanoparticles are characterized [5]. Variants of implementation of multiplex analysis for the simultaneous control of several contaminants / groups of contaminants are considered. The application of immunochromatographic test systems with video digital registration for the quantitative assessment of the analytes content is characterized [3,6,7]. The developed test systems are adapted for rapid (no more than 20-25 min, including sample preparation) control of toxic contaminants in milk and dairy products, meat and meat products, grain agricultural products [6,7].

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant 18-53-18013).

References:

1. Dzantiev B. B., Byzova N. A., Urusov A. E., Zherdev A. V. Immunochromatographic methods in food analysis // *Trends in Anal. Chem.* 2014. Vol. 55. P. 81-93.
2. Shan S., Lai W., Xiong Y., Wei H., Xu H. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens // *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63. № 3. P. 745–753.
3. Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Ways to reach lower detection limits in lateral flow immunoassays // Chapter 2. In: *Rapid Test – Advances in Design, Format and Diagnostic Applications* (Ed. L. Anfossi). London: InTechOpen, 2018. P. 9-43.
4. Zvereva E. A., Byzova N. A., Sveshnikov P. G., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Cut-off on demand: Adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol // *Anal. Methods.* 2015. Vol. 7. P. 6378-6384.
5. Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Use of gold nanoparticle-labeled secondary antibodies to improve the sensitivity of an immunochromatographic assay for aflatoxin B1 // *Microchim. Acta.* 2014. Vol. 181. № 15-16. P. 1939-1946.
6. Hendrickson O. D., Zvereva E. A., Shanin I. A., Tarannum N., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. A lateral flow immunoassay for simultaneous determination of antibiotics in dairy products // *J. Food: Microbiol., Safety & Hygiene.* 2018. Vol. 3. P. 63.
7. Urusov A. E., Gubaidullina M. K., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Efficient rapid immunochemical tests for mycotoxins detection in foods // *J. Food: Microbiol., Safety & Hygiene.* 2018. Vol. 3. P. 75.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

BIOLOGICAL TRANSFORMATIONS OF CONTAMINANTS IN THE NATURAL ENVIRONMENT: PATTERNS AND PRACTICAL ASPECTS

1. ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОМИЦИНА НА СИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА СООБЩЕСТВОМ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА, З. Е. Мащенко, Т. В. Молчанова, В. В. Бахарева.....	590
THE EFFECT OF ERYTHROMYCIN ON THE SYNTHESIS OF EXTRACELLULAR PROTEIN IS A COMMUNITY OF MICROORGANISMS OF ACTIVE SLUDGE, Z. E. Mashchenko, T. V. Molchanova, V. V. Bakharev.....	591
2. ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА НИТРИФИКАЦИИ В БИОФИЛЬТРАХ С ИНТРОДУКЦИЕЙ МИКРОБНЫХ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР, Вдовина Т.В., Шагеева А.Ф., Сироткин А.С.....	592
INTENSIFICATION OF NITRIFICATION PROCESS IN BIOFILTERS BY THE INTRODUCTION OF MICROBIAL ENRICHMENT CULTURES, Vdovina T.V., Shageeva A.F. Sirotkin A.S.	593
3. ИНТЕНСИФИКАЦИЯ РАБОТЫ АЭРОБНОГО АКТИВНОГО ИЛА МАЛЫХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ, Хохлачев Н.С., Пыстина Н.Б., Фалин А.Г.....	594
INTENSIFICATION OF AEROBIC ACTIVATED SLUDGE OF SMALL SEWAGE TREATMENT PLANTS, N.S. Khokhlachev, N.B. Pystina, A.G. Falin	594
4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ЛИКВИДАЦИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫХ СИТУАЦИЙ, Беловежец Л.А.....	595
USE OF MICROORGANISMS FOR RECTIFYING OF ENVIRONMENTAL DISASTERS, Belovezhets L.A.....	596
5. КИНЕТИКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ СОЛЕЙ ТЕТРАЗОЛИЯ КЛЕТОЧНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ БАКТЕРИЙ <i>Bacillus subtilis</i> , Сычев С.С., Калинина А.А., Соколова Т.Н.....	596
KINETICS OF THE RESTORATION OF TETRASOLY SALTS BY CELLULAR COMPONENTS OF BACTERIUM <i>BACILLUS SUBTILLIS</i> , Sychev S.S., Kalinina A.A., Sokolova T.N.....	598
6. МИКРООРГАНИЗМЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ФЛУОРЕНА, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ЗАПАДНОГО КАЗАХСТАНА, Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Ауэзова О.Н.	599
MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF FLUORENE ISOLATED FROM OIL-POLLUTED SOILS OF THE WESTERN KAZAKHSTAN, Faizulina E.R., Aitkeldiyeva S.A., Tatarkina L.G., Auezova O.N.....	600
7. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ В ПОЧВАХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПСИХРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ КРИОЛИТОЗОНЫ, Ерофеевская Л.А.....	601
STUDY OF BIOLOGICAL DEGRADATION OF OIL POLLUTANTS IN SOILS UNDER THE INFLUENCE OF PSYCHROPHILIC MICROORGANISMS IN PERMAFROST, Erofeevskaya L. A.	601
8. ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БИОПРЕПАРАТА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА «АРКОЙЛ» НА ПРИМЕРЕ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ, Ильин А.А., Кочкаров А.Х.- М., Жариков Г.А. , Жариков М.Г.	602
INDUSTRIAL TREATMENT OF OIL SLIME AT OIL REFINERY USING "ARCOIL" BIOPREPARATION, Ilyin A.A., Kochkarov A.Kh.-M., Zharikov G.A., Zharikov M.G.	603
9. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАККАЗ <i>TRAMETES HIRSUTA</i> 072 ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КРАСИТЕЛЕЙ, Савинова О.С., Моисеенко К.В., Тяжелова Т.В., Федорова Т.В., Васина Д.В.....	603
EVALUATION OF <i>Trametes hirsuta</i> 072 LACCASES EFFICIENCY FOR DYES MODIFICATION, Savinova O.S., Moiseenko K.V., Tyazhelova T.V., Fedorova T.V., Vasina D.V.	605
10. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ - НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ В БИОРЕМЕДИАЦИИ ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЫ, Третьякова М.С., Беловежец Л. А., Соколова Л.Г., Зорина С.Ю., Маркова Ю.А.	606
ASSESSMENT OF THE EFFICIENCY OF THE APPLICATION OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS - OIL DESTRUCTORS IN BIOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED SOIL, Tretyakova M.S., Belovezhets L.A., Sokolova L.G., Zorina S.Y., Markova Yu. A.....	607

11. ПЕРСПЕКТИВЫ БИОУТИЛИЗАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ С ПОМОЩЬЮ НАСЕКОМЫХ, Ушакова Н.А., Бастраков А.И.	607
PROSPECTS OF UTILIZATION OF ORGANIC WASTE BY INSECTS, Ushakova N.A., Bastrakov A.I.	608
12. ПОВЫШЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОПРЕПАРАТОВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГУМАТОВ, Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Лойко Н.Г., Атрошчик Е.А.	609
IMPROVING THE STABILITY AND EFFICIENCY OF BIOPREPARATIONS FOR HYDROCARBON ACID BACTERIA USING HUMATES, Nikolaev Yu.A., El-Registan G.I., Loiko N.G., Atroshchik Ye.A.	610
13. СЕЛЕКТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АПТАМЕРОВ В КАЧЕСТВЕ РЕЦЕПТОРНЫХ МОЛЕКУЛ, Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.	611
SELECTIVITY OF DETECTION OF HEAVY METALS WITH THE USE OF APPAMERS AS RECEPTOR MOLECULES, Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.	612
14. СКРИНИНГ И СРАВНИТЕЛЬНОЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ КРАХМАЛ ПОД ВЛИЯНИЕМ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ, Сорокина К.Н., Пилигаев А.В., Самойлова Ю.В., Пармон В.Н.	612
SCREENING AND COMPARATIVE METABOLIC PROFILING OF STARCH-PRODUCING MICROALGAL STRAINS UNDER THE INFLUENCE OF STRESS FACTORS, Sorokina K.N., Piligaev A.V., Samoylova Y.V., Pamon V.N.	614
15. ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫЕ КУЛЬТУРЫ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ЗАПАДНОГО КАЗАХСТАНА, Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А.	615
THERMOTOLERANT CULTURES OF OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS FOR BIOREMEDIATION OF OIL-POLLUTED SOILS OF THE WESTERN KAZAKHSTAN, Aitkeldiyeva S.A., Faizulina E.R., Auezova O.N., Tatarkina L.G., Spankulova G.A.	616

УДК 574.24

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОМИЦИНА НА СИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА СООБЩЕСТВОМ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА

З.Е. Мащенко, Т.В. Молчанова, В.В. Бахарев.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет», Самара, Россия
443100, Россия, г. Самара, ул. Молодогвардейская д. 244
e-mail: mzinaida@yandex.ru

Исследовано влияние эритромицина на синтез внеклеточного белка сообществом микроорганизмов на диловой жидкости.

Ключевые слова: эритромицин; синтез; активный ил; внеклеточный белок.

Во многих странах мира были проведены работы по обнаружению лекарств в окружающей среде. Результаты исследований показали, что лекарственные средства являются неотъемлемыми органическими загрязнениями сточных вод в США, странах ЕС и России. Вместе со сточными водами фармацевтические препараты попадали в природные и поверхностные воды.

Наиболее часто встречающиеся в сточных водах являются антибиотики, анальгетики, стероиды и бета-блокаторы. Лекарственные средства в окружающей среде могут негативно влиять на состояние живых организмов. В частности, систематическое загрязнение воды противомикробными средствами приводит к возникновению резистентных форм микроорганизмов и появлению возбудителей устойчивых к названным препаратам. Кроме того, находящиеся в сточных водах антибиотики могут влиять на микроорганизмы самого ила, нарушать процессы метаболизма, приводящие к ухудшению качества биологической очистки [1].

Одним из показателей роста и жизнедеятельности микроорганизмов активного ила является количество продуцируемого ими внеклеточного белка. Накопление внеклеточного белка защищает организмы от неблагоприятного воздействия загрязняющих веществ; интенсифицирует процесс сорбции загрязняющих веществ активным илом на первых стадиях очистки [2].

Цель работы – изучить влияние эритромицина на синтез внеклеточного белка сообществом микроор-

ганизмов надидовой жидкости активного ила.

Эритромицин – антибиотик класса макролидов, обладает бактериостатическим действием, нарушает образование пептидных связей между молекулами аминокислот и блокирует синтез белков микроорганизмов [3].

Для изучения влияния эритромицина на синтез внеклеточного использовалась надидовая жидкость активного ила городских очистных сооружений ОАО Самарские коммунальные системы. Исследовали действие антибиотика в концентрациях: 0,1 – 0,3 – 0,5 – 1 – 2 – 3 и 5 мг/мл. Эксперимент проводился в течение трех суток, пробы брались каждые 24 часа. Была использована синтетическая среда следующего состава: глюкоза – 10 г/л, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 1 г/л, NaCl – 3 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,2 г/л, CaCl_2 – 0,5 г/л, pH = 8,5. Содержание белка в пробах определяли спектрофотометрически [4].

Эритромицин во всех концентрациях подавлял синтез белка в течение всего периода инкубации. В первые 24 часа инкубации происходило максимальное подавление синтеза белка при действии эритромицина во всех пробах. Через 48 часов инкубации количество белка во всех пробах увеличилось. В течение третьих суток инкубации в пробах с содержанием антибиотика от 0,1 до 1 мг/мл скорость синтеза белка была на уровне 48 часов инкубации, а в пробах с содержанием антибиотика 3-5 мг/мл – снизилась по сравнению с 48 часами инкубации.

Таким образом, установлена способность эритромицина подавлять синтез внеклеточного белка сообществом микроорганизмов. Эти данные соответствуют фармакологическому действию антибиотика [3].

Литература:

1. Маслова Е. В., Машенко З. Е., Шаталаев И. В. Лекарственные препараты в окружающей среде // Аспирантский вестник Поволжья. 2017. – №1-2. – С. 215-217.
2. Дрегуло А. М. Проблемы эколого-химической детоксикации активного ила и его использование в биологической очистке сточных вод: дис. ...к-та техн. наук. – Санкт-Петербург, 2014. – 144 с.
3. Харкевич Д. А. Фармакология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 908 с.
4. Анализ влияния БАВ на синтез внеклеточного белка сообществом микроорганизмов активного ила городских очистных сооружений МУП «Водоканал» / Н. А. Югина, А. И. Хабибрахманова, Р. И. Шайхиева и др. // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17. – № 23. – С. 251-252.

UDC 574.24

THE EFFECT OF ERYTHROMYCIN ON THE SYNTHESIS OF EXTRACELLULAR PROTEIN IN A COMMUNITY OF MICROORGANISMS OF ACTIVE SLUDGE

Z.E. Mashchenko, T.V. Molchanova, V.V. Bakharev

Federal state budgetary educational institution of higher education "Samara state technical University", Samara, Russia
443100, Russia, Samara, Molodogvardeyskaya str., 244
e-mail: mzinaida@yandex.ru

The effect of erythromycin on the synthesis of extracellular protein microorganism the supernatant liquid of the activated sludge.

Key words: erythromycin; synthesis; activated sludge; extracellular protein.

In many countries of the world, work has been done to detect drugs in the environment. The results of studies have shown that drugs are an integral organic pollution of wastewater in the United States, EU and Russia. Together with the wastewater of pharmaceutical drugs fall into natural surface water.

The most common in wastewater are antibiotics, analgesics, steroids and beta-blockers. Drugs in the environment can adversely affect the condition of living organisms. In particular, the systematic contamination of water with antimicrobial agents leads to the emergence of resistant forms of microorganisms and the emergence of pathogens resistant to these drugs. In addition, antibiotics in wastewater can affect the microorganisms of sludge itself, disrupt metabolic processes leading to deterioration of the quality of biological treatment [1].

One of the indicators of growth and activity of microorganisms of activated sludge is the amount of extracellular protein produced by them. The accumulation of extracellular protein protects organisms from the adverse effects of pollutants; intensifies the process of sorption of pollutants with activated sludge in the first stages of purification [2].

The aim of this work was to study the effect of erythromycin on the synthesis of extracellular protein

microorganism the supernatant liquid of the activated sludge.

Erythromycin is an antibiotic of the macrolide class, has bacteriostatic action, disrupts the formation of peptide bonds between amino acid molecules and blocks the synthesis of microbial proteins [3].

To study the effect of erythromycin on the synthesis of extracellular used the supernatant liquid of the activated sludge. of municipal wastewater treatment plants of Samara municipal systems. The action of antibiotic in concentrations was investigated: 0,1 – 0,3 – 0,5 – 1 – 2 – 3 and 5 mg/ml. the experiment was Conducted for three days, samples were taken every 24 hours. The synthetic medium of the following composition was used: glucose – 10 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 1 g/l, NaCl – 3 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,2 g/l, CaCl_2 – 0,5 g/l, pH = 8,5. Protein content in samples was determined spectrophotometrically [4].

Erythromycin in all concentrations inhibited protein synthesis throughout the incubation period. During the first 24 hours of incubation, protein synthesis was suppressed to the maximum extent by erythromycin in all samples. After 48 hours of incubation, the amount of protein in all samples increased. During the third day of incubation in samples with antibiotic content from 0.1 to 1 mg/ml, the rate of protein synthesis was 48 hours of incubation, and in samples with antibiotic content of 3-5 mg/ml – decreased compared to 48 hours of incubation.

Thus, the ability of erythromycin to inhibit the synthesis of extracellular protein community of microorganisms. These data correspond to the pharmacological action of the antibiotic [3].

References:

1. Maslova E. V., Mashchenko Z.E., Shatalaev I. F. Medicines in the environment // *The Postgraduate Bulletin of the Volga region.* – 2017. – No. 1-2. – P. 215-217.
2. Dragula A. M. Problems of ecological-chemical detoxification of activated sludge and its use in biological sewage treatment: dis. ... candidate of technical Sciences. – St. Petersburg, 2014. – 144 p.
3. Kharkevich D. A. Pharmacology. – M.: GEOTAR-Media, 2010. – 908 p.
4. Analysis of the influence of BAS on the synthesis of extracellular protein microorganism of activated sludge of urban wastewater treatment facilities of MUP "Vodokanal" / N. Yugina A., A. I. Khabibrakhmanova, R. I. Shaikhieva and others // *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta.* – 2014. – Vol. 17. – No. 23. – P. 251-252.

УДК 628.35

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА НИТРИФИКАЦИИ В БИОФИЛЬТРАХ С ИНТРОДУКЦИЕЙ МИКРОБНЫХ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Вдовина Т.В., Шагеева А.Ф., Сироткин А.С.

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, Россия
420015, Казань, ул. Карла Маркса, д. 68
e-mail: tvkirilina@gmail.com

Оценены возможность и эффективность биоаугментации нитрифицирующих бактерий в микробиоценоз биопленки биофильтрационной системы для повышения качества очистки сточных вод.

Ключевые слова: нитрифицирующие микроорганизмы; биофильтрация сточных вод; биоаугментация; флуоресцентная *in situ* гибридизация

Актуальным направлением экспериментальных исследований в области биологической очистки сточных вод является формирование высокоэффективного микробиоценоза очистных сооружений, в том числе путем применения технологии биоаугментации [1,2].

Проведен 30-ти суточный процесс непрерывной биофильтрации модельного раствора коммунально-бытовых сточных вод. Лабораторная установка состояла из двух параллельно работающих биофильтров, заполненных керамзитом и оснащенных системой аэрации [3]. В один из биофильтров после пускового периода осуществляли интродукцию нитрифицирующих бактерий. В качестве последних использовали ранее выделенные из активного ила, используемого, в том числе, для первоначальной инокуляции биофильтрационной системы, аммонийокисляющие (АОМ) и нитритокисляющие (НОМ) бактерии [4]. Второй биофильтр выступал в качестве контрольной системы.

Биоаугментация АОМ в микробиоценоз биофильтрационной системы привела к увеличению эффективности удаления аммонийного азота в среднем в 1,6 раза относительно контрольного биофильтра. Последующая биоаугментация в этот биофильтр НОМ обусловила увеличение количества нитратов в очищенной воде в среднем в 2 раза относительно контрольного биофильтра.

Выявлено, что биоаугментация нитрифицирующих бактерий в микробиоценоз биопленки приводит к сокращению времени выхода системы биофильтрации на режим достижения нормативных значений очистки по аммонийному азоту в 2,4 раза относительно контроля.

Количественная и качественная идентификация микроорганизмов методом флуоресцентной *in situ* гибридизации [5] выявила увеличение количества нитрифицирующих микроорганизмов в составе биопленки опытного биофильтра, что свидетельствует об эффективности интродукции микроорганизмов и коррелирует с результатами биотрансформации соединений азота.

Таким образом, биоаугментация нитрифицирующих микроорганизмов в микробиоценоз биопленки является эффективным инструментом для повышения качества очистки сточных вод.

Литература:

1. Stenström F., la Cour Jansen J. Impact on nitrifiers of full-scale bioaugmentation // *Water science and technology*. 2017. Vol.76. №11. P. 3079-3085.
2. Zhu X., Chen M., He X., Xiao Z., Zhou H., Tan Z. Bioaugmentation treatment of PV wafer manufacturing wastewater by microbial culture // *Water science and technology*. 2015. Vol.72. №2. P. 754-761.
3. Кирилина Т.В. Биоконверсия соединений азота и фосфора в процессе биофильтрации сточных вод и их доочистки погруженными макрофитами: дис.... канд. техн. наук. – Казань, 2011. – С. 51-55.
4. Кирилина Т.В., Рахманкулова З.Ш., Сироткин А.С. Оценка способности нитрифицирующих микроорганизмов к образованию биопленок // *Вестник технологического университета*. - 2016. - Т.19, В.16. - С.152-154.
5. Nielsen P.H., Daims H., Lemmer H. *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment. Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. – London: IWA Publishing, 2009. – 123 p.

UDC 628.35

INTENSIFICATION OF NITRIFICATION PROCESS IN BIOFILTERS BY THE INTRODUCTION OF MICROBIAL ENRICHMENT CULTURES

Vdovina T.V., Shageeva A.F., Sirotkin A.S.

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia
420015, Kazan, Karl Marx Str. 68
e-mail: tvkirilina@gmail.com

The possibility and efficiency of nitrifying bacteria bioaugmentation in the microbiocenosis of the biofiltration system biofilm was assessed to increase the quality of wastewater treatment.

Key words: nitrifying microorganisms; wastewater biofiltration; bioaugmentation; fluorescent in situ hybridization

The current trends of experimental research in the field of biological wastewater treatment is the formation of highly efficient microbiocenosis of wastewater treatment plants, particularly including the using of bioaugmentation technology [1,2].

A 30-day continuous process of domestic wastewater model solution biofiltration was carried out. The laboratory setup consisted of two parallel working biofilters, filled with expanded clay and equipped with an aeration system [3]. After the start-up period, nitrifying bacteria were introduced into one of the biofilters. The ammonium-oxidizing (AOM) and nitrite-oxidizing (NOM) bacteria, previously isolated from activated sludge used also for the initial inoculation of the biofiltration system, were applied. [4]. The second biofilter acted as a control system.

The AOM bioaugmentation into the biofiltration system microbiocenosis has led to an increasing of the ammonium nitrogen removal efficiency by an average of 1.6 times relative to the control biofilter. The subsequent NOM bioaugmentation into this biofilter caused an increase in the amount of nitrates in treated water by an average of 2 times relative to the control biofilter.

It was revealed that bioaugmentation of nitrifying bacteria in the biofilm microbiocenosis leads to a reduction in the time to achieve the standard values for ammonium nitrogen by 2.4 times relative to the control.

Quantitative and qualitative identification of microorganisms by the method of fluorescent in situ hybridization [5] revealed an increase in the number of nitrifying microorganisms in the experimental biofilter biofilm composition, what indicates the effectiveness of the microorganisms introduction and correlates with the results of nitrogen compounds biotransformation.

Thus, bioaugmentation of nitrifying microorganisms in the biofilm microbiocenosis is an effective tool for improving the quality of wastewater treatment.

References:

1. Stenström F., la Cour Jansen J. Impact on nitrifiers of full-scale bioaugmentation // *Water science and technology*. 2017. Vol.76. №11. P. 3079-3085.
2. Zhu X., Chen M., He X., Xiao Z., Zhou H., Tan Z. Bioaugmentation treatment of PV wafer manufacturing wastewater by microbial culture // *Water science and technology*. 2015. Vol.72. №2. P. 754-761.
3. Kirilina T.V. Bioconversion of nitrogen and phosphorus in the wastewater biofiltration and after-treatment by submerged macrophytes: Dissertation PhD. - Kazan, 2011. - P. 51-55.
4. Kirilina T.V., Rachmankulova Z.S., Sirotkin A.S. Assessment of the nitrifying microorganisms ability to form biofilms // *Bulletin of the Technological University*. 2016. - Vol.19, №.16. - P.152-154.
5. Nielsen P.H., Daims H., Lemmer H. *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment. Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. – London: IWA Publishing, 2009. – 123 p.

УДК 628.355

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ РАБОТЫ АЭРОБНОГО АКТИВНОГО ИЛА МАЛЫХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Хохлачев Н.С.¹, Пыстина Н.Б.¹, Фалин А.Г.²

¹ООО «Газпром ВНИИГАЗ», поселок Развилка, Московская область, Россия
142717, Московская обл., Ленинский район, сельское поселение Развилковское, поселок Развилка,
Проектируемый проезд № 5537, владение 15, строение 1

²ООО «Газпром добыча Краснодар»
e-mail: Gagarin-88@yandex.ru

Проведены исследования реакции активного ила аэротенка малой производительности на воздействие агента стресса. Опыт проводился в условиях не сбалансированного состава сточной воды, а также не равномерности её поступления.

Ключевые слова: активный ил, очистка сточных вод, интенсификация аэротенков

В ходе проведенного обследования установок очистки сточных вод производительностью 50 м³/сут и 400 м³/сут был выявлен ряд недочетов в работе очистных сооружений, которые не позволяли выйти на проектный уровень очистки сточных вод. После изменения схемы работы аэротенков входящих в состав канализационных очистных сооружений удалось добиться стабильного количества активного ила в системе. После стабилизации концентрации активного ила был исследован профиль высеваемых микроорганизмов. Были проведены опыты с добавлением агента стресса для интенсификации работы микроорганизмов активного ила.

UDC 628.355

INTENSIFICATION OF AEROBIC ACTIVATED SLUDGE OF SMALL SEWAGE TREATMENT PLANTS

N.S. Khokhlachev¹, N.B. Pystina¹, A.G. Falin²

¹Gazprom VNIIGAZ LLC, Razvilka village, Moscow Region, Russia
142717, Moscow region, Leninsky district, Razvilkovsky, village Razvilka, 5537 Proyektiruyemyy Proyezd, possession
15, building 1

²LLC "Gazprom mining Krasnodar"
e-mail: Gagarin-88@yandex.ru

Studies of the reaction of activated sludge aerotank low productivity to the effects of the stress agent. The experiment was carried out in conditions of a non-balanced composition of the waste water, as well as non-uniformity of its receipt.

Key words: active sludge, wastewater treatment, aerotank intensification

In the course of the survey of wastewater treatment plants with a capacity of 50 m³/ day and 400 m³/ day, a number

of flaws in the operation of wastewater treatment plants were identified, which did not allow reaching the design level of wastewater treatment. After changing the operation of the aerotanks of the sewage treatment facilities, it was possible to achieve a stable amount of activated sludge in the system. After stabilization of the active sludge concentration, the profile of the sowed microorganisms was investigated. Experiments were conducted with the addition of a stress agent to intensify the work of microorganisms of activated sludge.

УДК 579.64

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ЛИКВИДАЦИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫХ СИТУАЦИЙ

Беловежец Л.А.

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1

e-mail: lyu-sya@yandex.ru

Исследована биологическая активность (фитотоксичность, ферментативная активность, динамика численности микроорганизмов различных таксономических групп) субстратов микробной переработки или почвы, в которой происходит микробная деструкция загрязнителя.

Ключевые слова: микробная переработка, фитотоксичность, ферменты

В процессе производственной деятельности человек создает огромное количество продуктов. Их создание, как правило, сопровождается выбросом в окружающую среду промышленных отходов. Возникающие на предприятиях аварийные ситуации многократно увеличивают выбросы. В то же время часть отходов может являться сырьем для других, более экологически выгодных производств. На данный момент одним из наиболее перспективных методов ликвидации последствий самых разнообразных промышленных действий человека является их биологическая переработка с помощью микроорганизмов, способных использовать экологически вредные субстраты. Существует единый подход к применению микроорганизмов для ликвидации экологически опасных ситуаций, связанных с хозяйственной деятельностью человека, заключающийся в скрининге микроорганизмов, потенциально способных к переработке того или иного агента, и дальнейшем создании препарата на их основе. Однако всегда остаются вопросы, связанные с процессами, происходящими при микробной деструкции, в особенности изменениями биологических параметров.

Нашей задачей было оценить изменения биологических свойств субстратов микробной переработки или почвы, в которой происходит микробная деструкция загрязнителя. Мы использовали следующие интегральные параметры: фитотоксичность, ферментативная активность, динамика численности микроорганизмов различных таксономических групп. В качестве субстратов были использованы – гидролизный лигнин, древесные опилки различных пород деревьев, почвы, загрязненные нефтью.

Результаты исследования показали, что, независимо от субстрата, микробное воздействие приводит к резкому усилению фитотоксичности, вплоть до полного подавления прорастания семян. Мы связываем это с появлением в процессе микробной модификации субстрата токсичных продуктов его распада (в нашем случае это низкомолекулярные фенольные соединения), что подтверждается повышением уровня полифенолоксидазной и пероксидазной активности. К концу процесса микробной переработки эти показатели снижаются до минимальных значений, а фитотоксичность достигает контрольных значений. Динамика численности микроорганизмов зависит от процесса. Так, в случае переработки лигноцеллюлозных отходов, количество микроорганизмов всех исследованных групп очень высоко, а динамика численности коррелирует с динамикой температуры перерабатываемой массы. В случае нефтяного загрязнения, активность микрофлоры почвы ниже, причем на первых этапах очистки преобладает грибная и бактериальная микрофлора, а численность актиномицетов возрастает лишь по мере очищения почвы.

Таким образом, можно утверждать, что микробная переработка обязательно приводит к всплеску токсичности перерабатываемого субстрата, однако за счет эффективной работы ферментов и увеличения численности микроорганизмов, различных по субстратной специфичности и типу питания, к окончанию переработки токсичность не отличается от контроля, а все показатели биологической активности приходят в норму. Соответственно, процессы, без обработки растягивающиеся на десятилетия, происходят в течение 2-3 месяцев и приводят к полному отсутствию токсичности продукта.

UDC 579.64

USE OF MICROORGANISMS FOR RECTIFYING OF ENVIRONMENTAL DISASTERS

Belovezhets L.A.

*A. E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 1 Favorsky Str., 664033, Irkutsk, Russian Federation
664033, Irkutsk, ul. Favorsky, 1
e-mail: lyu-sya@yandex.ru*

Explored the changes of the biological properties (phytotoxicity, enzymatic activity, and dynamics of the number of microorganisms of different taxonomic groups) of microbial processing substrates or soil, where microbial destruction of the contaminant occurs.

Key words: microbial processing, phytotoxicity, enzymes

A person creates a lot of products in its human activity. This process, as a rule, is accompanied by the environmental discharge of industrial wastes. The emissions are repeatedly increased in case of an emergency situation at the facilities. At the same time, some of the wastes can be feedstocks for other, more environmentally beneficial, industries. At the moment, one of the most promising methods to rectify the consequences of various industrial human actions is their biological processing with the help of microorganisms capable of using environmentally harmful substrates. There is a unified approach to use microorganisms for rectifying of environmental disasters, associated with human economic activity that consists in the screening of microorganisms potentially capable of processing an agent and the subsequent creation of a medicine based on them. However, there are always issues related to the processes occurring at the microbial destruction, especially, the changes in biological parameters.

Our task is to evaluate the changes of the biological properties of microbial processing substrates or soil, where microbial destruction of the contaminant occurs. We have used the following integral parameters: phytotoxicity, enzymatic activity, and dynamics of the number of microorganisms of different taxonomic groups. Substrates used have been hydrolytic lignin, wood sawdust of various trees, soils contaminated with oil.

The study results have showed that, regardless of the substrate, the microbial effect leads to dramatic phytotoxicity growth, up to the complete suppression of seed germination. We associate it with the appearance of its toxic decomposition products during the microbial modification of the substrate (in our case it is low-molecular phenolic compounds), that is confirmed by an increase of polyphenoloxidase and peroxidase activities. By the end of the microbial processing these indicators are reduced to the minimum values, and phytotoxicity reaches the control values. The dynamics of the number of microorganisms depends on the process. So, in case of lignocellulosic waste processing, the number of microorganisms of all the groups studied is very high, and the volume dynamics correlates with the temperature one of the processed mass. In case of oil pollution, the activity of soil microflora is lower, and the number of actinomycetes increases only with the soil purification, though in the first stages of purification the fungus and bacterial microflora prevail.

Thus, it can be argued that microbial processing necessarily leads to the toxicity surge of the processed substrate, but due to the efficient work of the enzymes and the increase in the number of microorganisms, different in substrate specificity and type of nutrition, the toxicity is not varied from the control to the end of the treatment, but all indices of the biological activity come back to normal. Accordingly, the processes, without treatment prolonged for decades, are within 2-3 months and lead to the complete absence of product toxicity.

УДК 579.262

КИНЕТИКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ СОЛЕЙ ТЕТРАЗОЛИЯ КЛЕТОЧНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILLIS*

Сычев С.С., Калинина А.А., Соколова Т.Н.

*ФГБОУ ВО Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, Нижний Новгород, Россия
603950, Нижний Новгород, ул. Минина, д. 24
e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru*

Изучен вклад дыхательной активности *Bacillus subtilis* в восстановление ИНТ. Изучено влияние на начальную скорость восстановления ИНТ клетками бактерий малоната и глюкозы.

Ключевые слова: йоднитротетразолия хлорид, бактерии *Bacillus subtilis*, индикатор жизнеспособности бактерий, дыхательная активность

Ранее нами было показано, что восстановление йоднитротетразолия хлорида (ИНТ) клеточными компонентами бактерий, суспензированными в физиологическом растворе описывается линейной анаморфозой кинетики первого порядка [1,2]. Было выявлено, что эффективная константа скорости восстановления соли тетразолия *Bacillus subtilis* в $8 \div 11$ раз превышает $k_{\text{эф}}$ при участии грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* и *Escherichia coli*.

На основании существенных различий в эффективных константах скорости и значениях параметров активации было сделано предположение, что реакция контролируется диффузией ИНТ в клетку, которая, в свою очередь, зависит от строения клеточной стенки.

Вместе с тем, в периодически появляющихся публикациях, продолжает дискутировать роль в восстановлении солей тетразолия организации дыхательной цепи, на чем и основано их использование как индикаторов жизнеспособности бактерий [3].

В продолжение исследований в настоящей работе изучен вклад дыхательной активности *Bacillus subtilis* в восстановление ИНТ.

Введение в реакционную систему малоната ($C = 10^{-5} \div 10^{-3} M$) приводит к снижению начальной скорости восстановления ИНТ в $2 \div 10$ раз, вплоть до полного ингибирования процесса при высоких концентрациях ($C \approx 0,1 M$). Поскольку малонат – известный конкурентный ингибитор фермента сукцинатдегидрогеназы, то замедление скорости в его присутствии однозначно свидетельствует о вкладе флавиновых коферментов в восстановительный процесс. Вместе с тем, использование в качестве реакционной среды раствора глюкозы с тем же осмотическим давлением, что и физиологический раствор не привело к существенному изменению кинетических характеристик, хотя углеводный источник питания должен стимулировать дыхательный процесс.

Использование трифенилтетразолия хлорида (ТФТ) выявило низкую восстановительную активность *Bacillus subtilis*. Начальная скорость восстановления ($C_{\text{ТФТ}} = 10^{-5}$; $t = 37 \pm 2^\circ C$, физиологический раствор) на 3 порядка ниже скорости восстановления ИНТ.

Таким образом, восстановление солей тетразолия равнозначно зависит от нескольких факторов, что целесообразно учитывать при их использовании в экологических и других исследованиях.

Литература:

1. Калинина А.А., Македошин А.С., Гурский Н.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф. Кинетическое исследование восстановления йоднитротетразолия хлорида суспензией в физиологическом растворе бактерий *Pseudomonas aeruginosa* // Теоретическая и прикладная экология. – 2018. – №1. – С. 25-32.
2. Калинина А.А., Радостин С.Ю., Македошин А.С., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф., Карташов В.Р. Моделирование условий биотрансформации кислорода бактериями- органотрофами в пероксид водорода, стимулирующий коррозию цинка // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7, № 2 (21). – С. 80-88.
3. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Фокина А.И. Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязненных средах // Теоретическая и прикладная экология. – 2008. – № 2. – С. 23-28.

UDC 579.262

KINETICS OF THE RESTORATION OF TETRASOLY SALTS BY CELLULAR COMPONENTS OF BACTERIUM *BACILLUS SUBTILLIS*

Sychev S.S., Kalinina A.A., Sokolova T.N.

Nizhny Novgorod State Technical University R.E. Alekseeva, Nizhny Novgorod, Russia
603950, Nizhny Novgorod, ul. Minina 24
e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

The contribution of the respiratory activity of *Bacillus subtilis* to the restoration of INT has been studied. The effect of the malonate and glucose bacteria on the initial rate of INT recovery by cells was studied.

Key words: iodonitrotetrazolium chloride, bacteria *Bacillus subtilis*, indicator of bacterial viability, respiratory activity

We have previously shown that the recovery of iodonitrotetrazolium chloride (INT) by cellular components of bacteria suspended in saline is described by a linear anamorphosis of first-order kinetics [1, 2]. It was found that the effective rate of recovery of the tetrazolium salt of *Bacillus subtilis* is 8 ÷ 11 times the keff rate with the participation of gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli*.

Based on significant differences in effective rate constants and values of activation parameters, an assumption was made that the reaction is controlled by the diffusion of INT into the cell, which, in turn, depends on the structure of the cell wall.

At the same time, in periodically appearing publications, the role in the restoration of the tetrazolium salts of the organization of the respiratory chain continues to be debated, on which their use is based as indicators of the viability of bacteria.

In continuation of the research in this paper, we studied the contribution of the respiratory activity of *Bacillus subtilis* to the restoration of INT.

Introduction to the reaction system of malonate ($C = 10^{-5} \div 10^{-3}$ M) leads to a decrease in the initial rate of reduction of the INT by a factor of 2÷10, up to complete inhibition of the process at high concentrations ($C \approx 0.1$ M). Since malonate is a well-known competitive inhibitor of the enzyme succinate dehydrogenase, a slowdown in its presence in its presence unambiguously indicates the contribution of flavin coenzymes to the recovery process. However, using a glucose solution as the reaction medium with the same osmotic pressure as the physiological solution did not lead to a significant change in the kinetic characteristics, although the carbohydrate power source should stimulate the respiratory process.

The use of triphenyltetrazolium chloride (TFT) revealed a low reducing activity of *Bacillus subtilis*. The initial recovery rate (TFT = 10^{-5} ; $t = 37 \pm 2^\circ$ C, saline) is 3 orders of magnitude lower than the recovery rate of INT.

Thus, the reduction of tetrazolium salts equally depends on several factors, which it is expedient to take into account when using them in environmental and other studies.

References:

1. Kalinina A.A., Makedoshin A.S., Gursky N.V., Sokolova T.N., Smirnov V.F. Kinetic study of the recovery of iodonitrotetrazolium chloride by suspension in the physiological solution of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* // Theoretical and Applied Ecology. — 2018. — №1. — С. 25-32.
2. Kalinina A.A., Radostin S.Y., Makedoshin A.S., Sokolova T.N., Smirnov V.F., Kartashov V.R. Modeling of bacteria-organotrophs oxygen biotransformation to hydrogen peroxide stimulating zinc corrosion. Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2017. — Vol. 7, №. 2. — pp. 80–88.
3. Domracheva, L.I., Kondakova, LV, Ashikhmina, T.Ya., Ogorodnikova, S.Yu., Olkova, AS, Fokina, A.I. Application of the tetrazole-topographic method for determining the dehydrogenase activity of cyanobacteria in polluted environments // Theoretical and Applied Ecology. — 2008. — № 2. — p. 23-28.

МИКРООРГАНИЗМЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ФЛУОРЕНА, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ЗАПАДНОГО КАЗАХСТАНА

Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Ауэзова О.Н.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан
050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103
e-mail: ecomicrolab@gmail.com

Из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана выделены углеводородоокисляющие микроорганизмы, способные расти на флуорене. Изучена деструкция исследуемого субстрата этими культурами. Наиболее активные штаммы практически полностью утилизировали флуорен за 15 суток.

Ключевые слова: полициклические ароматические углеводороды, флуорен, углеводородоокисляющие микроорганизмы, деструкция

Одной из острых экологических проблем современности является загрязнение экосистем полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ). Они создают серьезную угрозу для здоровья населения, поскольку обладают токсическими, мутагенными и канцерогенными свойствами. Основными источниками эмиссии ароматических углеводородов в окружающую природную среду являются предприятия энергетического комплекса, автомобильный транспорт, химическая и нефтеперерабатывающая промышленности. Они встречаются практически повсюду, но около 90% экологической нагрузки приходится на почвы. Одним из наиболее распространенных ПАУ, обнаруженных в окружающей среде, является флуорен, являющийся одним из приоритетных загрязнителей по версии EPA.

Поступление в почву больших количеств промышленных отходов, в особенности вредных химических примесей органического происхождения, приводит к постепенному уменьшению концентрации гумусного азота, замедлению или полному прекращению размножения гумифицирующих микроорганизмов.

В связи с серьезной опасностью для окружающей среды и здоровья человека ПАУ стали в последнее время объектом всесторонних исследований. Актуальным направлением среди них является микробиологическая деградация этих соединений. Несомненно, что биологические способы очистки природной среды наиболее безопасны, эффективны и менее затратны по сравнению с методами химической и физической очистки.

Поскольку в Казахстане высокими темпами развивается нефтегазовая промышленность, проблема загрязнения окружающей среды ароматическими углеводородами стоит весьма остро, т.к. они менее подвержены деструкции. В связи с этим весьма актуальным является поиск активных штаммов микроорганизмов-деструкторов полициклических ароматических углеводородов, обитающих в определенных эколого-географических условиях и их использование в процессах биоремедиации загрязненной окружающей среды.

Из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана методом накопительных культур было выделено 118 изолятов. В результате проведенного скрининга на агаризованной среде с флуореном было отобрано 68 культур, хорошо растущих на этом субстрате. Изучен их рост, а также 10 коллекционных штаммов в жидкой среде с флуореном в качестве единственного источника углерода и энергии. Результаты исследования показали, что из всех проверенных культур только 11 проявили высокую активность при росте на этом углеводороде. При этом их биомасса возрастала в 2-3,7 раза.

Изучена деструкция флуорена в концентрации 50 мг/л четырьмя коллекционными и семью новыми культурами углеводородоокисляющих микроорганизмов. Установлено, что через сутки наблюдалась убыль субстрата на 6,7-43,8%. К 3-м суткам повышенная активность выявлена у двух культур, которые утилизировали около 70% углеводорода. Через 7 суток под воздействием этих же культур деструкция флуорена составила 82,6-98,2%. Большинство культур практически полностью деградировали субстрат к 15 суткам. Только при культивировании четырех штаммов в среде оставалось незначительное количество флуорена – 3,4-20,6%. На протяжении всего эксперимента естественная убыль исследуемого углеводорода была незначительной и к 15 суткам составила 4,88%.

Таким образом, проведенные исследования показали, что все отобранные культуры показали высокую деструкционную активность по отношению к флуорену.

UDC 579.66

MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF FLUORENE ISOLATED FROM OIL-POLLUTED SOILS OF THE WESTERN KAZAKHSTAN

Faizulina E.R., Aitkeldiyeva S.A., Tatarkina L.G., Auezova O.N.

LP «Scientific Production Center of Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, Bogenbay batyr str., 103
e-mail: ecomicrolab@gmail.com

Hydrocarbon-oxidizing microorganisms capable to grow on fluorene have been isolated from oil-polluted soils of the Western Kazakhstan. The destruction of the investigated substrate by these cultures was studied. The most active strains almost completely utilized fluorene in 15 days.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons, fluorene, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, destruction

One of the acute environmental problems of our time is the pollution of ecosystems with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). They pose a serious threat to public health, since they have toxic, mutagenic and carcinogenic properties. The main sources of the emission of aromatic hydrocarbons into the environment are enterprises of the energy complex, automobile transport, chemical and oil refining industries. They are found almost everywhere, but about 90% of the environmental load falls on the soil. One of the most common PAHs found in the environment is fluorene, which is one of the priority pollutants of the EPA version.

The entry into the soil of large quantities of industrial waste, especially harmful chemical impurities of organic origin, leads to a gradual decrease in the concentration of humus nitrogen, slowing down or completely stopping the reproduction of humifying microorganisms.

Due to the serious danger to the environment and human health, PAHs have recently become the subject of extensive research. The actual direction among them is the microbiological degradation of these compounds. There is no doubt that biological methods of cleaning the natural environment are the safest, most effective and less expensive compared to methods of chemical and physical cleaning.

Since the oil and gas industry is developing at a high rate in Kazakhstan, the problem of environmental pollution by aromatic hydrocarbons is very acute, since they are less susceptible to destruction. In this regard, the search for active strains of micro-organisms-destroyers of polycyclic aromatic hydrocarbons living in certain ecological-geographical conditions and their use in the processes of bioremediation of a polluted environment is highly relevant.

Of the oil-contaminated soils of Western Kazakhstan, 118 isolates were isolated by the method of enrichment cultures. As a result of the screening on agar medium with fluorene, 68 cultures that grew well on this substrate were selected. Their growth was studied, as well as 10 collection strains in a liquid medium with fluorene as the sole source of carbon and energy. The results of the study showed that from all tested cultures, only 11 showed high activity with growth on this hydrocarbon. At the same time, their biomass increased by 2-3.7 times.

The destruction of fluorene at a concentration of 50 mg/l by four collection and seven new cultures of hydrocarbon-oxidizing microorganisms was studied. It was found that a day later a decrease in the substrate was observed at 6.7-43.8%. By the 3rd day, increased activity was detected in two cultures, which utilized about 70% of the hydrocarbon. After 7 days under the influence of these same cultures, the destruction of fluorene was 82.6-98.2%. Most cultures almost completely degraded the substrate by 15 days. Only with the cultivation of four strains in the medium remained a small amount of fluorene - 3.4-20.6%. Throughout the experiment, the natural decrease in the hydrocarbon studied was insignificant, and by the 15th day it was 4.88%.

Thus, studies have shown that all selected cultures showed high destructive activity with respect to fluorene.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ В ПОЧВАХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПСИХРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ КРИОЛИТОЗОНЫ

Ерофеевская Л.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем нефти и газа Сибирского отделения Российской академии наук
677890, Россия, город Якутск, ул. Октябрьская, д. 1,
e-mail: lora-07.65@mail.ru

Изучены процессы биологической деградации нефтезагрязнений в мерзлотных почвах под влиянием психрофильных микроорганизмов. Комплексом аналитических методов установлена высокая степень деградации нефтезагрязнений после очистки мерзлотных почв селективными штаммами.

Ключевые слова: нефть, микроорганизмы, почва, деградация, углеводороды

В настоящее время психрофильные микроорганизмы, способные к деструкции нефтезагрязнений в условиях криолитозоны представляют практический интерес.

С целью разработки технологии очистки нефтезагрязненных почв на аварийных территориях нефтегазового комплекса Якутии, выполнены лабораторно-полевые эксперименты по изучению влияния биопрепаратов на основе психрофильных микроорганизмов на активацию биологической деградации нефтезагрязнений.

Из объектов окружающей среды выделены и идентифицированы методом секвенирования гена 16S рибосомальной РНК 40 штаммов психрофильных и психротолерантных углеводородокисляющих микроорганизмов.

По результатам изучения состава и химической структуры выделенных экстрактов почвенных проб после обработки биопрепаратами на основе полученных углеводородокисляющих микроорганизмов установлена высокая степень деградации нефтезагрязнений, как в условиях короткого северного лета (56-97%), так и в условиях экстремально холодной зимы (34-62%).

Сохранение жизнеустойчивости селективных штаммов при экстремально низких температурах (-45...-50 °C) и возобновление их метаболической активности при оттаивании почвы позволяет применять их для очистки почв вне периода вегетации (т.е. зимой или «под зиму») в труднодоступных районах, в отсутствие подъездных путей к месту аварии в зимнее время.

Биодеградация нефтезагрязнений в почвах под воздействием биопрепаратов наряду с уменьшением общего содержания углеводов сопровождается увеличением количества асфальто-смолистых компонентов, изменением соотношения алканов нормального и изопреноидного строения [1, 92-100].

Литература:

1. Ерофеевская Л.А., Глянцева Ю.С. Формирование консорциума УОМ для очистки почв от нефтезагрязнений в природно-климатических условиях Якутии // Естественные и математические науки в современном мире / Сборник статей по материалам 17 международной научно-практической конференции №4 (16). – Новосибирск: Изд. «СибАК». – 2014. – С. 92–100.

UDC 579.26, 663.15

STUDY OF BIOLOGICAL DEGRADATION OF OIL POLLUTANTS IN SOILS UNDER THE INFLUENCE OF PSYCHROPHILIC MICROORGANISMS IN PERMAFROST

Erofeevskaya L. A.

Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Oil and Gas Problems, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 677890, Russia, city of Yakutsk, Oktyabrskaya St, 1
e-mail: lora-07.65@mail.ru

Processes of biological degradation of petropollution in merzlotny soils under the influence of psychrophile microorganisms are studied. The complex of analytical methods established high extent of degradation of petropollution after cleaning of merzlotny soils with selektirovanny strains.

Key words: oil, microorganisms, soil, degradation, hydrocarbons

Currently, psychrophilic microorganisms capable of destroying oil pollution in permafrost conditions are of practical interest.

In order to develop a technology for cleaning oil-polluted soils in the emergency areas of the Yakutia oil and gas complex, field experiments were carried out to study the effect of biologics based on psychrophilic microorganisms on the activation of biological degradation of oil pollution.

From environmental objects, 40 strains of psychrophilic and psychrotolerant hydrocarbon-oxidizing microorganisms were isolated and identified by sequencing the 16S gene of ribosomal RNA.

According to the results of the study of the composition and chemical structure of the isolated extracts of soil samples after treatment with biological products based on the obtained hydrocarbon-oxidizing microorganisms, a high degree of degradation of oil pollution was established both in the conditions of the short northern summer (56-97%) and in the conditions of an extremely cold winter (34-62%).

Preserving the viability of the selected strains at extremely low temperatures (-45... -50 °C) and the resumption of their metabolic activity during thawing of the soil allows them to be used to clean the soil outside the growing season (ie, in winter or "before winter") in hard-to-reach areas, in the absence of access roads to the accident site in winter.

The biodegradation of oil pollution in soils under the influence of biologics along with a decrease in the total hydrocarbon content is accompanied by an increase in the number of asphalt-resinous components, a change in the ratio of alkanes of normal and isoprenoid structure [1, 92-100].

References:

1. Erofeevskaya L. A., Gliaznetzova Y. S. The formation of a consortium of activization of hydrocarbon oxidative microorganisms to clean soil from oil spills in the climatic conditions of the Yakutia // Natural and mathematical sciences in the modern world / Collection of articles on the materials of the 17th international scientific-practical conference №4 (16). - Novosibirsk: Izd. «SibAK». - 2014. - pp. 92–100.

ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БИОПРЕПАРАТА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА «АРКОЙЛ» НА ПРИМЕРЕ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Ильин А.А.¹, Кочкаров А.Х.- М.¹, Жариков Г.А.², Жариков М.Г.¹

¹ ООО «Нижегородский институт прикладных технологий», 603163, г. Нижний Новгород, ул. Германа Лопатина, д. 8
e-mail: ruslan@nipt.ru

² ФГБУН «Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов»
ФМБА РФ, 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина 102А
e-mail: zharikov@toxicbio.ru

Проведена переработка 120000 м³ нефтешламов из накопителя МНПЗ «Капотня» с использованием нового, высокоэффективного микробиологического препарата «Аркойл». В результате деструкции получается нетоксичный субстрат, пригодный для отсыпки дорог и рекультивации свалок.

Ключевые слова: нефтешламы, микроорганизмы-деструкторы, биоремедиация

Добыча и переработка нефти в России, так и за рубежом, сопряжена с высоким загрязнением окружающей среды. На сегодняшний день нет более насущной и актуальной проблемы, чем разработка эффективных и экологически безопасных технологий восстановления окружающей среды от нефтепродуктов. Эти вещества устойчивы к деградации, аккумулируются в почве и обладают токсическими, мутагенными и канцерогенными свойствами. Наиболее полно требованиям экологичности отвечают технологии биоремедиации почв с использованием специальных штаммов микроорганизмов-деструкторов.

В ходе многоплановых исследований получена ассоциация из 5 природных штаммов микроорганизмов-деструкторов, обладающих высокой эффективностью деструкции нефтешламов, безопасных для

теплокровных животных. На их основе получен и зарегистрирован новый биопрепарат «Аркойл», разработана технология его применения в полевых условиях.

С использованием биопрепарата «Аркойл» проведена переработка нефтешламов из накопителя Московского нефтеперерабатывающего завода «Капотня». Работы проводили круглогодично на специально оборудованной площадке с подогревом в течение 3 лет. Общий объем переработанных нефтешламов составил 120 000 м³. В результате деструкции получается нетоксичный субстрат, пригодный для отсыпки дорог и рекультивации свалок.

Таким образом, биопрепарат «Аркойл» показал свою высокую эффективность по деструкции нефтешламов и рекомендуется для дальнейшего промышленного применения.

INDUSTRIAL TREATMENT OF OIL SLIME AT OIL REFINERY USING “ARCOIL” BIOPREPARATION

Ilyin A.A.¹, Kochkarov A.Kh.-M.¹, Zharikov G.A.², Zharikov M.G.¹

¹ OOO “Nizhny Novgorod Institute of Applied Technologies”, 8, German Lopatin street, Nizhny Novgorod, 603163, Russia
e-mail: ruslan@nipt.ru

² SFES “Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations” of Federal Medical-Biological Agency of Russia, 102A, Lenin str., Serpukhov, 142253, Moscow region, Russia
e-mail: zharikov@toxicbio.ru

Treatment of 120 000 m³ oil slime from a slime pit of “Kapotnya” oil refinery was performed using a novel highly-efficient microbiological preparation “Arcoil”. As a result of degradation non-toxic substrate suitable for road filling and landfill recultivation was obtained.

Key words: oil slime, microorganisms-degraders, bioremediation

Oil extraction and refining is associated with high levels of environmental pollution both in Russia and abroad. Presently there is no challenge more vital and pressing than to develop efficient and environmentally friendly technologies for remediation of territories contaminated with oil products. These substances are resistant to degradation, can accumulate in soil and possess toxic, mutagenic, and carcinogenic properties. Soil bioremediation technologies involving special strains of microorganisms-degraders are the best in meeting the environmental safety requirements.

As a result of multidimensional studies an association of 5 natural strains of microorganisms-degraders possessing high oil slime degradation efficacy and safety for warm-blooded animals was obtained. On their basis a novel biopreparation “Arcoil” was formulated and registered, and the relevant application technology in field conditions was developed.

Oil slime from a slime pit of “Kapotnya” oil refinery was processed using the “Arcoil” biopreparation. The year-round works were performed for 3 years on a specially allocated heated site. The total amount of oil slime processed made up 120 000 m³. As a result of degradation non-toxic substrate suitable for road filling and landfill recultivation was obtained.

Thus, the “Arcoil” biopreparation demonstrated high efficacy in oil slime degradation and is recommended for further industrial use.

УДК 579.6; 574.635

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАККАЗ TRAMETES HIRSUTA 072 ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КРАСИТЕЛЕЙ

Савинова О.С., Моисеенко К.В., Тяжелова Т.В., Федорова Т.В., Васина Д.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,
e-mail: savinova_os@rambler.ru

Проведена оценка возможности использования изоферментов лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072 (LacA, rLacC, rLacD, rLacF) для обесцвечивания красителей. Показано, что все изоферменты проявляют активность при деградации красителей, причем минорные rLacD и rLacF являются наиболее перспективными для деградации конго красного и фенолового красного.

Ключевые слова: изоферменты, лакказы, *Trametes hirsuta*, красители

Предприятия, производящие и использующие красители, оказывают значимое негативное воздействие на окружающую среду из-за выброса токсичных отходов [1]. Известно, что различные окислительные ферменты микроорганизмов, в том числе лакказы (ЕС 1.10.3.2) грибного происхождения, широко востребованы для детоксикации сточных вод в разных отраслях промышленности. В геномах базидиомицетов лакказы кодируются мультигенными семействами и число генов может достигать семнадцати [2]. При этом, их белковые продукты отличаются по физико-химическим свойствам.

В ходе аннотации генома *Trametes hirsuta* 072 было установлено, что в нем содержится семь генов (*lacA-G*), кодирующих изоферменты лакказ [3]. Ранее нами были выделены и охарактеризованы нативный мажорный изофермент LacA и рекомбинантные минорные изоферменты LacC, LacD, LacF, полученные с помощью гетерологичной экспрессии в грибах *Penicillium canescens*. Сравнительный анализ свойств этих изоферментов показал, что они существенно отличаются по каталитическим и биохимическим характеристикам [4,5].

В настоящей работе мы оценили способность изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 к деградации 4 синтетических красителей: конго красного (группа азокрасителей), индигокармина (индигоидная группа), бромфенолового синего и фенолового красного (трифенилметановая группа). Поскольку значения ОВП активного центра лакказ не всегда позволяют эффективно модифицировать ксенобиотики, были использованы также лакказа-медиаторные системы (ЛМС), позволяющие расширить спектр действия ферментов. В качестве медиаторов использовали: АБТС, 1-гидроксibenзотриазол, ванилин, синаповая кислота, феруловая кислота, $K_4Mo(CN)_8$ и $K_4Fe(CN)_6$. Степень деградации красителя оценивалась по остаточной оптической плотности растворов красителей после обработки чистыми изоферментами и ЛМС в течение 24 часов.

Полученные результаты показали, что конго красный лучше всего обесцвечивался ЛМС rLacD+АБТС и rLacD+ $K_4Mo(CN)_8$. Аналогичный результат был получен при обработке этого красителя системой rLacF+АБТС. Наилучший результат при обесцвечивании индигокармина обеспечивался применением rLacD и rLacF в сочетании с $K_4Mo(CN)_8$, а для бромфенолового синего - rLacF без медиатора и rLacD+ $K_4Mo(CN)_8$. LacA также был способен обесцвечивать последний, как в чистом виде, так и в сочетании со всеми использованными медиаторами, кроме АБТС. Для красителя фенолового красного наилучший результат был получен при использовании rLacD+АБТС и rLacF+АБТС.

Таким образом, из исследуемых изоферментов минорные rLacD и rLacF в сочетании с медиаторами представляют наибольший интерес для применения в биотехнологии для детоксикации сточных вод, содержащих красители.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (№18-04-00983).

Литература:

1. Forgacs E., Cserhati T. and Oros G.. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review// *Environment International*. 2004. Vol. 30. P. 953–971.
2. Kilaru S., Hoegger P.J., Kües U., The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies// *Curr. Genet*. 2006. Vol. 50. P. 45–60.
3. 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.
4. Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. Properties of two laccases of *Trametes hirsuta* 072 multigene family. Twins with different faces// *Biochimie*. 2017. Vol. 142. P. 183–190.
5. Vasina D.V., Savinova O.S., Chulkin A.M., Vavilova E.A., Moiseenko K.V., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V., Heterologous expression of three minor laccases from *Trametes hirsuta* 072 and their properties// 43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS). 2018. FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1). P. 173.

EVALUATION OF TRAMETES HIRSUTA 072 LACCASES EFFICIENCY FOR DYES MODIFICATION

Savinova O.S., Moiseenko K.V., Tyazhelova T.V., Fedorova T.V., Vasina D.V.

Bach Institute of Biochemistry, The Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, Russia;
119071, Leninsky prospekt, 33, build. 2,
e-mail: savinova_os@rambler.ru

Laccase isoenzymes from *Trametes hirsuta* 072 (LacA, rLacC, rLacD, rLacF) were evaluated for ability to four dyes bleaching. It was shown that all isoenzymes are efficient for dyes degradation, among them rLacD and rLacF isoenzymes comprised the most promising agents for the degradation of recalcitrant congo red and phenol red dyes.

Key words: isoenzymes, laccase, *Trametes hirsuta*, dyes

The wastewaters of industrial enterprises producing and using toxic compounds, such as various synthetic dyes, strongly affect the environment [1]. Analysis of the literature suggests that various oxidative enzymes of microorganisms, incl. laccases (EC 1.10.3.2) of fungal origin are widely sought for detoxification of industrial wastewaters. It is known that genomes of basidiomycetes contain laccases multigene families with the number of encoded genes up to 17 [2]. Moreover, their protein products differ in physic-chemical properties significantly.

Annotation of the *Trametes hirsuta* 072 genome revealed seven genes encoding laccase isoenzymes (lacA-G) [3]. The native major isoenzyme LacA and recombinant minor isoenzymes LacC, LacD and LacF, obtained by heterologous expression in *Penicillium canescens*, were isolated and characterized earlier. A comparative analysis of these isoenzymes properties showed significant differences in catalytic properties [4, 5].

In this work, we studied the degradation activity of *T. hirsuta* 072 laccase isoenzymes against four dyes: congo red (azo group of dyes), indigo carmine (indigoid group), bromophenol blue and phenol red (triphenylmethane group).

Since the individual laccases does not always allow to modify xenobiotics effectively dew to RedOx potential limitations of enzymes active center, in addition to the pure laccases different laccase-mediator systems (LMS) were tested. The following mediators were used: ABTS, 1-hydroxybenzotriazole, vanillin, synapic acid, ferulic acid, $K_4Mo(CN)_8$ and $K_4Fe(CN)_6$. The degradation degree of the dyes was estimated by the residual optical density of the dye solutions after 24 h of treatment by both pure laccases and LMSs.

The results showed that congo red was best bleached by LMS rLacD+ABTS and rLacD+ $K_4Mo(CN)_8$. A similar result was also obtained when this dye was treated by rLacF+ABTS. The best result of indigo carmine bleaching was achieved by using rLacD and rLacF in combination with $K_4Mo(CN)_8$; for bromophenol blue – by rLacF without any mediators and by using rLacD+ $K_4Mo(CN)_8$. The LacA effectively decolorized bromophenol blue both independently and in combination with all mediators, with exception of ABTS. The best result for phenol red was obtained using rLacD+ABTS and rLacF+ABTS LMSs.

Thus, among the tested isozymes, rLacD and rLacF in combination with mediators are of most interest for application in biotechnology for detoxification of dyes containing in wastewater.

This work was supported by Grant of Russian Foundation for Basic Research № 18-04-00983.

Литература:

1. Forgacs E., Cserhati T. and Oros G.. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review// *Environment International*. 2004. Vol. 30. P. 953–971.
2. Kilaru S., Hoegger P.J., Kües U., The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies// *Curr. Genet*. 2006. Vol. 50. P. 45–60.
3. 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.
4. Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. Properties of two laccases of *Trametes hirsuta* 072 multigene family. Twins with different faces// *Biochimie*. 2017. Vol. 142. P. 183–190.
5. Vasina D.V., Savinova O.S., Chulkin A.M., Vavilova E.A., Moiseenko K.V., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V., Heterologous expression of three minor laccases from *Trametes hirsuta* 072 and their properties// 43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS). 2018. FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1). P. 173.

УДК 631.427.4

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ - НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ В БИОРЕМЕДИАЦИИ ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЫ

Третьякова М.С.¹, Беловежец Л. А.², Соколова Л.Г.¹, Зорина С.Ю.¹, Маркова Ю.А.¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, д. 132

²Институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия
664033, Иркутск, ул. Фаворского, д. 1
e-mail: marina-tretjakova@yandex.ru

Проведена оценка перспективности использования ризосферных микроорганизмов – нефтедеструкторов для целей биоремедиации загрязненных нефтью почв в условиях модельного эксперимента. Показано, что в присутствии штаммов происходило повышение эффективности разложения углеводородов нефти в загрязненной почве.

Ключевые слова: микроорганизмы-нефтедеструкторы, нефтезагрязненная почва, нефть, биодеструкция нефти

В настоящее время загрязнение нефтью и нефтепродуктами является актуальной проблемой техногенного загрязнения окружающей среды. Наиболее интенсивному воздействию подвергается почва, которая способна аккумулировать и закреплять токсические вещества в большей степени, чем атмосфера и природные воды (Данилин и др., 2016). Цель настоящей работы - оценка перспективности использования ризосферных микроорганизмов в процессе биоремедиации почвы, загрязненной сырой нефтью.

В работе были использованы аборигенные штаммы микроорганизмов, выделенные из ризосферы растений, которые произрастали на нефтезагрязненной территории Иркутской области (Третьякова и др., 2015). Эти микроорганизмы показали способность активно разлагать нефть и выживать при высоких концентрациях нефти в жидкой минеральной среде (Беловежец и др., 2017).

Эффективность выделенных микроорганизмов для целей биоремедиации загрязненной нефтью почвы определяли на основе убыли нефти, по определению фитотоксичности почвенного раствора, по показателям эмиссии CO₂. Использовали серую лесную почву, которую искусственно загрязняли нефтью в концентрации 10% (V/V), затем инокулировали суспензией микроорганизмов-деструкторов. Контролем служила незагрязненная нестерильная почва. Вторым контролем – нестерильная почва, искусственно загрязненная нефтью. Инкубацию почвы проводили в течение 60 сут при температуре 26 °С.

В результате исследований было показано, что утилизация нефти за 60 сут эксперимента в варианте без бактерий составила 45%, в варианте с бактериями – до 70% от исходного загрязнения. При внесении микроорганизмов в загрязненную почву снижалось токсическое действие углеводородов нефти на растение (до 1,5 раз), увеличивалась интенсивность почвенного дыхания (до 74% относительно варианта без бактерий).

Таким образом, штаммы, выделенные из ризосферы растений, являются перспективными нефтедеструкторами при биоремедиации нефтезагрязненной территории.

Литература:

1. Беловежец Л.А., Макарова Л.Е., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Дударева Л.В., Семенова Н.В. Возможные пути деструкции полиароматических углеводородов нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов, выделенными из эндо и ризосферы растений // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 1. – С. 76-81.
2. Данилин О.Е., Пряхин В.В., Ситдилов Ф.Р. Воздействие нефтепромышленного комплекса на окружающую среду // Технические науки. – 2016. – № 10-11. – С. 38-44.
3. Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А. Скрининг - бактерий, ассоциированных с растениями, по способности деструктировать компоненты нефти. Системы. Методы. Технологии. – 2015. – № 4. – С. 138-142.

ASSESSMENT OF THE EFFICIENCY OF THE APPLICATION OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS - OIL DESTRUCTORS IN BIOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED SOIL

Tretyakova M.S.¹, Belovezhets L.A.², Sokolova L.G.¹, Zorina S.Y.¹, Markova Yu. A¹.

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, 664033, Irkutsk, Lermontov Street, 132

²A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, 664033, Irkutsk, St. Favorsky, 1

e-mail: marina-tretyakova@yandex.ru

The assessment of the prospects of using rhizosphere microorganisms - oil destructors for the purpose of bioremediation of oil-polluted soils in a model experiment was carried out. It was shown that, in the presence of strains, there was an increase in the efficiency of the decomposition of petroleum hydrocarbons in polluted soil.

Key words: oil destructive microorganisms, oil contaminated soil, oil, oil biodegradation

Currently, pollution by oil and oil products is a pressing problem of anthropogenic pollution of the environment. The most intense impact is on the soil, which is able to accumulate and fix toxic substances to a greater extent than the atmosphere and natural waters (Danilin et al., 2016). The purpose of this work is to assess the prospects for the use of rhizosphere microorganisms in the process of bioremediation of soil contaminated with crude oil.

In this work, aboriginal strains of microorganisms isolated from the rhizosphere of plants, which grew in the oil-contaminated territory of the Irkutsk region (Tretyakova et al., 2015) were used. These microorganisms showed the ability to actively decompose oil and survive at high concentrations of oil in a liquid mineral medium (Belovezhets et al., 2017).

The effectiveness of the isolated microorganisms for the bioremediation of oil-polluted soil was determined on the basis of the loss of oil, by the definition of phytotoxicity of the soil solution, in terms of CO₂ emissions. A gray forest soil was used, which was artificially polluted with oil at a concentration of 10 % (V / V), then inoculated with a suspension of destructive microorganisms. The control was uncontaminated non-sterile soil. The second control is non-sterile soil, artificially polluted with oil. Soil incubation was carried out for 60 days at a temperature of 26 ° C.

As a result of research, it was shown that the utilization of oil for 60 days of the experiment in the variant without bacteria was 45%, in the variant with bacteria - up to 70% of the initial pollution. When microorganisms were introduced into contaminated soil, the toxic effect of petroleum hydrocarbons on the plant decreased (up to 1.5 times), the intensity of soil respiration increased (up to 74% relative to the variant without bacteria).

Thus, the strains isolated from the plant rhizosphere are promising oil destructors during the bioremediation of an oil-contaminated area.

References:

1. Belovezhets L.A., Makarova L.E., Tretyakova M.S., Markova Yu.A., Dudareva L.V., Semenova N.V. Possible ways of destruction of polyaromatic petroleum hydrocarbons by some types of bacteria-oil destructors isolated from the plant endo and rhizosphere // *Applied biochemistry and microbiology*. - 2017. - T. 53. - № 1. - P. 76-81.
2. Danilin O.E., Pryakhin V.V., Sitdikov F.R. Environmental impact of the oil industry complex // *Technical Sciences*. - 2016. - № 10-11. - P. 38-44.
3. Tretyakova M.S., Belovezhets L.A., Markova Yu.A. Screening of bacteria associated with plants for their ability to destruct oil components. *Systems Methods Technology*. - 2015. - № 4. - P. 138-142.

УДК 57.047

ПЕРСПЕКТИВЫ БИОУТИЛИЗАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ С ПОМОЩЬЮ НАСЕКОМЫХ

Ушакова Н.А., Бастраков А.И.

ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, Москва, Россия

119071 Москва, Ленинский пр., 33

e-mail: naushakova@gmail.com

Проведен аналитический обзор перспектив помышленной биоутилизации органических отходов с помощью насекомых и представлены собственные разработки научных основ биоконверсии различных субстратов личинками мухи черная львинка *Hermetia illucens*.

Ключевые слова: органические отходы, личинки, *Hermetia illucens*, конверсия

К числу глобальных современных проблем относится накопление органических отходов и дефицит полноценного протеина. Поиск новых источников белка - важнейшее стратегическое направление, а утилизация отходов – не менее важная экологическая задача. Одним из наиболее перспективных видов насекомых для промышленного разведения и биоконверсии органических отходов во всем мире признана муха черная львинка *Hermetia illucens* (1). Главные преимущества черной львинки: насекомое технологично для круглогодичного промышленного выращивания. Не является сельскохозяйственным вредителем. Считается, что мухи не являются переносчиками возбудителей заболеваний. Отличаются относительно коротким жизненным циклом, высокой плодовитостью. Личинки способны развиваться практически на любых твердых органических отходах. В результате биоконверсии субстратов образуется белковая биомасса личинок и зоокомпост, который используется как органическое удобрение.

В мире уже имеются промышленные производства черной львинки. Наиболее известные иностранные крупнотоннажные производители этого насекомого: предприятие Enterra Feed, Канада, переработка 36000 т отходов в год (производство 10 т/день протеина и жира, и 12 т/день удобрения); Agri-protein, ЮАР, производство в день 7 т MagMeal, 3 т MagOil и 7 т MagSoil. Действующие предприятия имеются в Нидерландах (Protix), Германии (*Hermetia Deutschland*); в Китае имеются предприятия по переработке пищевых отходов средней производительностью 3 тонны биомассы личинок или белкового продукта в сутки. Наиболее популярный субстрат, на котором выращиваются личинки – пищевые и ресторанные отходы, отходы продовольственных магазинных сетей, органические отходы АПК, зерновые отходы, отходы крупяного производства.

В России также развиваются опытно-промышленные производители черной львинки – ООО Экобелок (Московская область) и ООО Биогенезис (Пензенская область), которые перерабатывают 3-5 т органических отходов в сутки.

Нами разрабатываются научные основы процесса биопереработки органических субстратов насекомыми в условиях разведения их в чистой культуре. Получены показатели биоконверсии личинками *Hermetia illucens* различных органических отходов, зависимости эффективности переработки и скорости утилизации от химического состава субстрата, оценены некоторые свойства получаемой биомассы насекомого и зоокомпоста (2).

Литература:

1. Diener S., Solano N.M.S., Gutiérrez F.R., Zurbrugg C., Tockner K. Biological treatment of municipal organic waste using black soldier fly larvae // Waste biomass valor. –2011. –V.2. –P. 357-363.
2. Ушакова Н. А., Бастратов А. И., Карагодин В. П., Павлов Д. С. Особенности биоконверсии органических отходов личинками мухи *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae, Linnaeus, 1758)// Успехи современной биологии. – 2018. –Т.138. – №2. – С. 172-182.

UDC 57.047

PROSPECTS OF UTILIZATION OF ORGANIC WASTE BY INSECTS

Ushakova N.A., Bastrakov A.I.

FGBUN A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia
119071 Moscow, Leninsky Prospect, 33
e-mail: naushakova@gmail.com

The analytical review of prospects of industrial utilization of organic waste by means of insects is carried out and own developments of scientific bases of bioconversion of various substrates by larvae of a black soldier fly *Hermetia illucens* are presented.

Key words: organic waste, larvae, *Hermetia illucens*, conversion

Global current problems include the accumulation of organic waste and the lack of full-fledged protein. The search for new protein sources is the most important strategic direction, and waste management is an equally

important environmental task. One of the most promising insect species for industrial breeding and bioconversion of organic waste is recognized worldwide as a black soldier fly *Hermetia illucens* (1). The main advantages of the black soldier fly: insect technologically for year-round industrial cultivation. Not an agricultural pest. It is believed that flies are not carriers of pathogens. They have a relatively short life cycle, high fecundity. Larvae can develop on almost any solid organic waste. As a result of bioconversion of substrates, protein biomass of larvae and zoo compost are formed, which is used as organic fertilizer.

In the world there are already industrial production of black soldier fly. The most well-known foreign large-capacity producers of this insect: enterprise Enterra Feed, Canada, processing 36,000 tons of waste per year (production of 10 tons/day of protein and fat, and 12 tons/day of fertilizer); Agri-protein, South Africa, production per day 7 tons of MagMeal, 3 tons of MagOil and 7 tons of MagSoil. There are operating plants in the Netherlands (Protix), Germany (*Hermetia Deutschland*), and in China there are food waste processing plants with an average capacity of 3 tons of biomass of larvae or protein product per day. The most popular substrate on which larvae are grown is food and restaurant waste, waste from food store chains, organic waste from agriculture, grain waste, waste from grain production.

In Russia also developed the experimental-industrial manufacturers black soldier fly – LLC Ekobelok (Moscow region) and LLC Biogenesis (Penza region), which process 3-5 tons of organic waste per day. We are developing the scientific foundations of the bioprocessing of organic substrates by insects under conditions of their cultivation in pure culture. Indicators of bioconversion by *Hermetia illucens* larvae of various organic wastes, the dependence of processing efficiency and utilization rate on the chemical composition of the substrate were obtained, some properties of the resulting insect biomass and zoo compost were evaluated (2).

References:

1. Diener S., Solano N.M.S., Gutiérrez F.R., Zurbrugg C., Tockner K. Biological treatment of municipal organic waste using black soldier fly larvae // Waste biomass valor. – 2011. – V.2. – P. 357-363.
2. Ushakova N. A., Bastrakov I. A., Karagodin V. P., Pavlov D. S. Specific Features of Organic Waste Bioconversion by *Hermetia illucens* Fly Larvae (Diptera: Stratiomyidae, Linnaeus, 1758) // Biology Bulletin Reviews. - 2018. - Vol. 138. - №2. - P. 172-182.

УДК 579.695

ПОВЫШЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОПРЕПАРАТОВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГУМАТОВ

Николаев Ю.А.¹, Эль-Регистан Г.И.¹, Лойко Н.Г.¹, Атрощик Е.А.²

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, РФ, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

²ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», РФ, 125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д.20

В работе описана технология повышения стабильности и расширения биоразнообразия (диссоциативного спектра) биопрепаратов углеводородокисляющих бактерий с применением гуматов.

Ключевые слова: углеводородокисляющие бактерии, биопрепараты, увеличение срока хранения, расширение спектра действия, гуматы, ликвидация разливов нефти

В условиях высокого антропогенного давления на окружающую среду актуальными являются исследование деградационной активности микроорганизмов и создание эффективных биотехнологий очистки природных объектов, почв и вод, от техногенных загрязнителей, прежде всего – нефтепродуктов (Koshlaf, Ball, 2017). Использование микроорганизмов – биодеструкторов имеет недостатки: (1) микроорганизмы – биодеструкторы быстро теряют жизнеспособность; (2) биопрепараты имеют максимальную ферментативную активность к субстрату, на котором были выращены (Кузнецов с соавт., 2010).

Для стабилизации клеток углеводородокисляющих бактерий (УОБ) использовали препараты гуматов, т.к. известно, что они могут стабилизировать макромолекулы ферментов, повышать скорости ферментативных реакций и роста микроорганизмов (Демкина с соавт., 2017; Тихонов с соавт. 2010). Для повышения биодegradационного и интродуктивного потенциалов биопрепарата, вносимого в зону разлива нефтепродуктов, использовали прием расширения внутривидового биоразнообразия бактерий, их диссоциативного спектра. Этот подход основан на нашем наблюдении, что популяции, вырастающие из покоящихся клеток бактерий многих видов, характеризуются более широким спектром диссоциантов, чем исходная родительская популяция.

Объектом исследования были грамотрицательные бактерии *Acinetobacter junii*. Клетки выращивали на минеральной среде К1 с микроэлементами и пентадеканом. В работе использовали препараты гуматов: 1) Гумат натрия «Сахалинский» универсальный, ООО «Биомир 2000». 2) «Г.УМИ-20», ООО «НВП Башинком». 3) «Гумат+7» марки С, ООО «Аграрные технологии». 4) Препарат гумата калия «Гумиком» марки В, ООО «Эмульсионные технологии». Культуру бактерий выращивали до начала стационарной фазы роста, после чего добавляли препараты гуматов в концентрации 0.03-3.0 г/л.

В варианте без добавления гуматов численности жизнеспособных клеток *A.junii* быстро снижалась: через неделю – в 4 раза, к концу первого месяца хранения – на 2.5 порядка. Во всех опытных вариантах число жизнеспособных клеток было выше на протяжении всего периода исследований. Наибольший эффект действия гуматов наблюдался через месяц хранения: количество жизнеспособных клеток бактерий в образце при концентрации гуматов 0.6 г/л было в 11 раз выше по сравнению с контролем. Другие препараты гуматов также повышали выживаемость ацинетобактерий. Популяция родительского штамма акинетобактерий, характеризовалась доминированием одного фенотипа, S. Остальные варианты составляли совокупно не более 5%. После хранения доля основного варианта снижалась до 40-50%, а общее содержание минорных вариантов возрастало до 50-60%. Определенные фенотипы потребляли разные углеводороды более эффективно, чем родительский штамм, что обуславливает повышение эффективности разложения разных субстратов после внесения стабилизированного биопрепарата в место разлива нефтепродуктов.

Работа выполнена частично по гранту РФФИ № 18-29-05009 и госзаданию ГЗ № 0104-2019-0005.

Литература:

1. Koshlaf E., Ball A.S. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments *AIMS Microbiology*, 2017, 3(1): 25-49.
2. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В., Энгельхарт М., Вайссер Т, Чеботаева М.В. «Прикладная эколобио-технология», Москва, Биом, 2010, 1 том, стр. 472-620.
3. Дёмкина Е.В., Шаненко Е.Ф., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И. Модель регуляции ферментативной активности иммобилизованных ферментов (амилаз) в почве. *Микробиология*. 2017. Т. 86. № 2. С. 217-228.
4. Вятчина О.Ф. Влияние гуматов на углеводородокисляющие организмы и на агрегатное состояние олеофильных продуктов / О.Ф. Вятчина, Д.И. Стом, О.О. Горбачевская [и др.] // Бюл. ВСПЦ СО РАН. – 2007. – №2. – С. 165–169.
5. Тихонов В.В., Якушев А.В., Завгородняя Ю.А., Бызов Б.А., Демин В.В. Действие гуминовых кислот на рост бактерий. *Почвоведение. Серия: Биология почв*. 2010. № 3. С. 333–341.

UDC 579.695

IMPROVING THE STABILITY AND EFFICIENCY OF BIOPREPARATIONS FOR HYDROCARBON ACID BACTERIA USING HUMATES

Nikolaev Yu.A.¹, El-Registan G.I.¹, Loiko N.G.¹, Atroshchik Ye.A.²

¹FRC Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 119071, Moscow, Leninsky Prospect, 33, Building 2

²FSBEI HE "Russian University of Chemical Technology DI. Mendeleev, RF, 125480, Moscow, ul. Heroes Panfilovtsev, d.20

The paper describes the technology of increasing the stability and effectiveness of biodiversity (dissociative spectrum) of biopreparations of hydrocarbon-oxidizing bacteria using humates.

Key words: hydrocarbon-oxidizing bacteria, biological preparations, increase in shelf-life, activity spectrum widening, humates, oil spill remediation

Under conditions of high anthropogenic pressure on the environment, studies of the degradation activity of microorganisms and the creation of effective biotechnologies for cleaning natural objects, soils and waters, from technogenic pollutants, primarily oil products, are relevant (Koshlaf, Ball, 2017). The use of microorganisms - biodestructors has drawbacks: (1) microorganisms - biodestructors quickly lose their viability; (2) Biopreparations have the maximum enzymatic activity to the substrate on which they were grown (Kuznetsov et al., 2010).

To stabilize the hydrocarbon oxidizing bacteria (HOB) cells, humate preparations were used, since it is known that they can stabilize macromolecules of enzymes, increase the rates of enzymatic reactions and the growth of microorganisms (Demkina et al., 2017; Tikhonov et al. 2010). To increase the biodegradation and introductory potentials of a biological product, introduced into the area of the spill of oil products, we used the method of expanding the intrapopulation biodiversity of bacteria, their dissociative spectrum. This approach is based on our

observation that populations that grow out of dormant bacterial cells of many species are characterized by a wider spectrum of dissociants than the original parent population.

The object of the study was gram-negative bacteria *Acinetobacter junii*. Cells were grown on the mineral medium K1 with trace elements and pentadecane. In the work we used the preparations of humates: 1) Sodium humate "Sakhalin" universal, LLC "Biomir 2000". 2) "G. UMI-20", LLC "NVP Bashinkom". 3) "Humat + 7" of grade C, Agrarian Technologies LLC. 4) The preparation of potassium humate "Gumikom" mark B, LLC "Emulsion technology". The bacterial culture was grown until the beginning of the stationary growth phase, after which humate preparations were added at a concentration of 0.03–3.0 g / l.

In the variant without adding humates, the number of viable *A. junii* cells rapidly decreased: after a week - 4 times, by the end of the first month of storage - by 2.5 orders of magnitude. In all experimental variants, the number of viable cells was higher throughout the entire study period. The greatest effect of the humates was observed after one month of storage: the number of viable bacterial cells in the sample at a concentration of humates of 0.6 g / l was 11 times higher compared to the control. Other humates also increased the survival of acinetobacteria. The population of the parent strain of acinetobacteria, was characterized by the dominance of one phenotype, S. The remaining variants amounted to a total of not more than 5%. After storage, the share of the main variant decreased to 40-50%, and the total content of the minor variants increased to 50-60%. Certain phenotypes consumed different hydrocarbons more efficiently than the parent strain, which leads to an increase in the efficiency of decomposition of different substrates after the introduction of a stabilized biological product at the site of an oil spill.

The work was supported by RFBR grant № 18-29-05009 and by State task № 0104-2019-0005.

References:

1. Koshlaf E., Ball A.S. *Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments* AIMS Microbiology, 2017, 3 (1): 25-49.
2. Kuznetsov, A.E., Gradova, N.B., Lushnikov, S.V., Engelhart, M., Weisser T, Chebotaeva M.V. "Applied ecobiotechnology", Moscow, Binom, 2010, 1 volume, pp. 472-620.
3. Demkina, E.V., Shanenko, E.F., Nikolaev, Yu.A., El-Registan, G.I. MODEL OF REGULATION OF THE ENZYMATIVE ACTIVITY OF IMMOBILIZED ENZYMES (AMILAZ) IN SOIL. Microbiology. 2017. Vol. 86. No. 2. P. 217-228.
4. Vyatchina O.F. The influence of humates on hydrocarbon-oxidizing organisms and on the state of aggregation of oleophilic products / O.F. Vyatchina, D.I. Stom, O.O. Gorbachevskaya [et al.] // *Bull. HRCS RAMS*. - 2007. - №2. - p. 165–169.
5. Tikhonov V.V., Yakushev A.V., Zavgorodnyaya Yu.A., Byzov B.A., Demin V.V. The effect of humic acids on the growth of bacteria. *Soil science. Series: Soil Biology*. 2010. No. 3. P. 333–341.

УДК 543.9

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АПТАМЕРОВ В КАЧЕСТВЕ РЕЦЕПТОРНЫХ МОЛЕКУЛ

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

Проведена характеристика взаимодействия ДНК-аптамеров с ионами тяжелых и переходных металлов. Изучены процессы взаимодействия с ионами металлов комплексов аптамер-наночастица золота. Охарактеризованы возможности применения таких комплексов для детекции тяжелых металлов (ртуть, свинец) в присутствии других ионов при мониторинге объектов окружающей среды.

Ключевые слова: аптамеры, золотые наночастицы, тяжелые металлы, токсичные загрязнители

Для контроля тяжелых металлов (ртуть, свинец и других) в пробах природной воды востребованы методики, позволяющие проводить одностадийное бесприборное тестирование и через несколько минут оценивать его результаты. Эффективным решением для этой цели является использование наночастиц, модифицированных рецепторными молекулами и изменяющих свои свойства при взаимодействии рецепторов с катионами тяжелых металлов. В представляемом исследовании охарактеризованы возможности применения в анализе связанных с наночастицами золота аптамеров – олигонуклеотидных рецепторных молекул. Взаимодействие таких комплексов с ионами металлов приводит к изменению степени агрегированности наночастиц, что проявляется как изменение окраски коллоидного раствора. Проведенная

экспериментальная работа включала выбор наиболее эффективных аптамеров, определение режимов проведения анализа, влияния на получаемые результаты сторонних катионов, апробацию методик для контроля проб природной воды. Разработанные методики характеризуются экспрессностью (5 мин.), чувствительностью (пределы обнаружения – до 100 нг/мл), простотой проведения анализа и детектирования взаимодействия.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные основы и новые эффективные методы химического анализа и исследования структуры веществ и материалов».

UDK 543.9

SELECTIVITY OF DETECTION OF HEAVY METALS WITH THE USE OF APPAMERS AS RECEPTOR MOLECULES

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

Characterization of the interaction of DNA aptamers with ions of heavy and transition metals has been carried out. The processes of interaction of the aptamer-nanoparticle gold complex with metal ions have been studied. The possibilities of using such complexes for the detection of heavy metals (mercury, lead) in the presence of other ions when monitoring environmental objects are characterized.

Key words: aptamers, gold nanoparticles, heavy metals, toxic contaminants

For the control of heavy metals (mercury, lead and others) in samples of natural water, methods are needed that allow one-step out-of-laboratory testing and evaluate its results in a few minutes. An effective solution for this purpose is the use of nanoparticles modified by receptor molecules and changing their properties under the interaction of receptors with heavy metal ions. In the present study, the possibilities of using gold nanoparticles conjugated with aptamers (oligonucleotide receptor molecules) have been characterized. The interaction of such complexes with metal ions leads to a change in the degree of aggregation of the nanoparticles, which manifests itself as a change in the colloidal solution color. The carried out experimental work included the selection of the most effective aptamers, the determination of the modes of analysis, the influence on the results of third-party cations, the testing of methods for monitoring samples of natural water. The developed techniques are characterized by expressivity (5 min.), sensitivity (detection limits - up to 100 ng/ml), ease of analysis and detection of interaction. This work was supported by Program of the Presidium of the Russian Acad. Sci. "Fundamental Foundations and New Effective Methods of Chemical Analysis and Investigation of the Structure of Substances and Materials".

UDK 57.033

СКРИНИНГ И СРАВНИТЕЛЬНОЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ КРАХМАЛ ПОД ВЛИЯНИЕМ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

Сорокина К.Н.^{1,2}, Пилигаев А.В.¹, Самойлова Ю.В.¹, Пармон В.Н.^{1,2}

¹Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

Адрес для переписки: пр. академика Лаврентьева 5, Новосибирск, Россия, 630090

e-mail: sorokina@catalysis.ru

Проведено исследование влияния стрессовых условий (в том числе концентрации соединений азота и фосфора в среде, общей солености, а также при культивировании в муниципальных сточных водах) на продуктивность по крахмалу для штаммов микроводорослей относящихся к видам *Chlorella sorokiniana* и *Parachlorella kessleri*. Выявлено, что наибольшее влияние на продуктивность по крахмалу оказывает сни-

жение концентрации соединений фосфора и азота в среде. Анализ изменений в метаболизме при накоплении крахмала показал снижение концентрации аминокислот и увеличение метаболитов углеводного и липидного обмена в стационарной фазе роста.

Ключевые слова: микроводоросли, крахмал, жирные кислоты, метаболическое профилирование

Биомасса микроводорослей является перспективным источником возобновляемых полисахаридов (например, крахмала), применимых для получения биотоплива. При этом не все штаммы микроводорослей способны эффективно продуцировать крахмал, а физиологические основы процессов его накопления в клетках микроводорослей остаются малоизученными. Целью данной работы являлся скрининг свойств штаммов микроводорослей на способность продуцировать крахмал и анализ изменений их метаболизма под влиянием стрессовых факторов при культивировании на модельных субстратах (среда BBM) и на муниципальных сточных водах.

В работе использовали штаммы *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-2, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-9, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-15, *Parachlorella kessleri* IPPAS S-333, а также штамм *Parachlorella kessleri* IC-11, выделенный из активного ила очистных сооружений. Скрининг проводили как на синтетической среде BBM (с различной концентрацией фосфора, азота и при добавлении морской соли), а также с использованием муниципальных сточных вод. Установлено, что снижение содержания соединений азота и фосфора на 50% в исходной среде BBM приводило в среднем к полуторакратному увеличению содержания крахмала в стационарной фазе роста в сравнении с исходной средой для всех исследованных штаммов. Максимальным содержанием крахмала обладал штамм *Parachlorella kessleri* IC-11 в среде BBM с пониженным содержанием азота BBM-N (0,1 г/л NaNO_3), фосфора BBM-P (0,175/0,075 г/л $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$), а также в сточной воде, которое составило $36,9 \pm 1,3$; $38,7 \pm 2,2$; $36,3 \pm 3,1\%$, соответственно. Данный штамм обладает высокой продуктивностью биомассы $47,7 \pm 2,9$ мг/л/сут и специфической скоростью роста $0,09 \pm 0,01$ сут⁻¹ в среде BBM. Добавление соли в среду BBM и сточную воду свыше 1% значительно снижало продуктивность по крахмалу в стационарной фазе роста, но при этом индуцировало значительное накопление нейтральных липидов в клетках, что не было отмечено для других условий культивирования. Таким образом, показано, что штамм *Parachlorella kessleri* IC-11 обладает способностью к эффективной продукции биомассы с высоким содержанием крахмала на муниципальных сточных водах, что может в дальнейшем использоваться для получения биотоплива.

Также в работе проведено метаболическое профилирование штамма *Parachlorella kessleri* IC-11 в условиях максимального накопления крахмала (BBM-N и BBM-P), а также в качестве сравнения в исходной среде BBM. Показано, что метаболические профили штамма *Parachlorella kessleri* IC-11 в экспоненциальной фазе роста характеризуются высокими концентрациями аминокислот в клетках, в то время как стационарная фаза роста сопряжена с увеличением метаболитов углеводного и липидного обмена. Накопление крахмала при недостатке азота и фосфора в среде можно связать с замедлением процессов биосинтеза белка при продолжающейся фиксации углерода в клетки путем фотосинтеза и дальнейшей его трансформацией в крахмал. Изучение физиологии синтеза крахмала у перспективных штаммов-продуцентов имеет большое значение для направленного улучшения их метаболизма в пользу увеличения продукции крахмала.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-73-30032).

UDC 57.033

SCREENING AND COMPARATIVE METABOLIC PROFILING OF STARCH-PRODUCING MICROALGAL STRAINS UNDER THE INFLUENCE OF STRESS FACTORS

Sorokina K.N.^{1,2}, Piligaev A.V.¹, Samoylova Y.V.¹, Pamon V.N.^{1,2}

¹Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Correspondence address: pr. Lavrentieva 5, Novosibirsk, Russia, 630090

e-mail: sorokina@catalysis.ru

The influence of stress conditions (including the concentration of nitrogen and phosphorus compounds in the medium, the total salinity, cultivation in municipal wastewater) on starch productivity for microalgae strains belonging to the *Chlorella sorokiniana* and *Parachlorella kessleri* species was studied. It was found that the decrease in the concentration of phosphorus and nitrogen compounds in the medium most influences the productivity of starch. Analysis of metabolic changes during starch accumulation revealed a decrease in amino acid concentrations and an increase in carbohydrate and lipid metabolism metabolites in the stationary growth phase.

Key words: microalgae, starch, fatty acid, metabolic profiling

Microalgal biomass is a promising alternative source of renewable polysaccharides (including starch) for production of biofuel. However, not all of the strains are capable of producing starch, and the physiological basis of its accumulation processes in microalgae cells remains unstudied. The aim of this study was to screen the properties of microalgae strains for starch production and analyze changes in their metabolism during cultivation in synthetic medium and municipal wastewater under stress conditions.

Strains of *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-2, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-9, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-15, *Parachlorella kessleri* IPPAS S-333, strain *Parachlorella kessleri* IC-11 were isolated from activated sludge from the sewage treatment plant. The screening was performed in the BBM medium (with various concentrations of medium components, including the concentration of phosphorus, nitrogen and the addition of sea salt) and in wastewater from the sewage treatment plant.

It was shown that a decrease in the content of nitrogen and phosphorus compounds by 50% in the initial BBM medium resulted in a 1,5-fold increase in the starch content in the stationary growth phase as compared to the initial medium for all strains. The maximum starch content was observed for *Parachlorella kessleri* IC-11 strain under conditions with a reduced content of nitrogen BBM-N (0,1 g/L NaNO₃), phosphorus BBM-P (0,175/0,075 g/L KH₂PO₄/K₂HPO₄), cultivation in municipal wastewater and was 36,9 ± 1,3; 38,7 ± 2,2; 36,3±3,1%, respectively. This strain has a high biomass productivity of 47,7 ± 2,9 mg/L/day and a specific growth rate of 0,09 ± 0,01 in the BBM medium. The addition of salt in excess of 1% to BBM and wastewater significantly reduced the productivity of starch in the stationary growth phase, but at the same time induced a significant accumulation of neutral lipids in the cells, which was not observed for other culture conditions. Thus, the strain *Parachlorella kessleri* IC-11 is potentially applicable to the production of biomass with high starch content in municipal wastewater, which can be used to biofuel production.

A comparative GC/MS metabolic profiling of the *Parachlorella kessleri* IC-11 strain under conditions of maximum starch accumulation (BBM-N and BBM-P), and also as a comparison in the original BBM medium was also performed. It is shown that the metabolic profile of the *Parachlorella kessleri* IC-11 strain in the exponential growth phase is characterized by high concentration of amino acids in the cells, while the stationary growth phase is associated with an increase in carbohydrate and lipid content. The accumulation of starch at a nitrogen and phosphorus can be associated with the termination of protein biosynthesis with continued fixation of carbon into cells by photosynthesis and its further transformation into starch. The accumulation of starch under conditions of a lack of nitrogen and phosphorus in the medium can be associated with slowing down the processes of protein biosynthesis with a continued fixation of carbon into cells by photosynthesis and its further transformation into starch. Studies of the metabolism of the prospective strains will help to understand the nature of metabolic shifts responsible for biomass growth and starch accumulation and identify targets for increasing starch yield of microalgae strains.

This work was supported by the Russian Science Foundation, grant № 17-73-30032.

ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫЕ КУЛЬТУРЫ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ ЗАПАДНОГО КАЗАХСТАНА

Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан

050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103

e-mail: ecomicrolab@gmail.com

Из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана выделены термотолерантные нефтеокисляющие микроорганизмы. Проведен скрининг новых и коллекционных культур, способных расти на нефти при повышенных температурах. Изучена их нефтеокисляющая активность.

Ключевые слова: нефть, нефтяное загрязнение, деструкция нефти, термотолерантные нефтеокисляющие микроорганизмы

Возрастающее загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами приводит к серьезным нарушениям природных экосистем, биологического равновесия и биоразнообразия. Нефтяные углеводороды вызывают практически полную депрессию активности флоры и фауны, отрицательно действуя на все звенья биологической цепи. В связи с этим актуальным является разработка и внедрение высокоэффективных биотехнологий на основе использования микроорганизмов-деструкторов углеводородов для защиты окружающей среды. Поскольку проблема загрязнения природных экосистем нефтью и нефтепродуктами стоит крайне остро, во многих странах мира ведутся исследования по биоремедиации почвы и воды от этих поллютантов.

Одним из основных факторов, определяющих необходимость и способ применяемого ремедиационного подхода, является температурный режим. В зависимости от температуры бактериальная активность и скорость биodeградации могут сезонно изменяться. Так одной из главных проблем ремедиации территорий в условиях жаркого климата является тот факт, что высокие температуры снижают вязкость нефти и, таким образом, ускоряют ее диффузию вглубь грунта. Перспективными агентами ремедиации нефтезагрязненных участков в высокотемпературных регионах являются термотолерантные микроорганизмы, устойчивые к недостатку воды в грунте и повышенному содержанию соли в почве. Условия обитания таких микроорганизмов свидетельствуют о толерантности к экстремальным климатическим условиям и концентрациям загрязнителей. Климат нефтедобывающих регионов Казахстана характеризуется как резко-континентальный с резкими сезонными и суточными перепадами температур. Поэтому исследования, связанные с поиском и изучением термотолерантных микроорганизмов-деструкторов нефти, в настоящее время для Казахстана являются весьма актуальными.

В результате проведенного скрининга коллекционных культур нефтеокисляющих микроорганизмов были отобраны 23 культуры, показавшие хороший рост на нефти при 35°C и 9 культур – при 40°C. Из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана методом накопительных культур при температуре 35°C было выделено 15 изолятов, при 40°C – 7. Изучение окисления углеводородов нефти коллекционными культурами при 35°C показало, что при их культивировании деструкция нефти составила от 23,7 до 70,5%. При 40°C убыль нефти была в пределах 25-32%.

При культивировании вновь выделенных культур термотолерантных микроорганизмов в жидкой минеральной среде с нефтью степень ее деструкции при 35°C составила 18,7-52,0%, а при 40°C – 22,7-31,5%. Всего было отобрано 12 наиболее перспективных штаммов, которые в дальнейшем могут быть использованы для биоремедиации нефтезагрязненных экосистем в летний период времени в условиях аридного климата.

UDC 579.66

THERMOTOLERANT CULTURES OF OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS FOR BIOREMEDIATION OF OIL-POLLUTED SOILS OF THE WESTERN KAZAKHSTAN

Aitkeldiyeva S.A., Faizulina E.R., Auezova O.N., Tatarkina L.G., Spankulova G.A.

LP «Scientific Production Center of Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, Bogenbay batyr str., 103
e-mail: ecomicrolab@gmail.com

Thermotolerant oil-oxidizing microorganisms have been isolated from oil-contaminated soils of the Western Kazakhstan. Screening of new and collection cultures capable to grow on oil at elevated temperatures has been carried out. Their oil oxidizing activity was studied.

Key words: oil, oil pollution, oil destruction, thermotolerant oil-oxidizing microorganisms

Increasing environmental pollution with oil and oil products leads to serious disturbances of natural ecosystems, biological equilibrium and biodiversity. Oil hydrocarbons cause almost complete depression of the activity of flora and fauna, negatively acting on all links of the biological chain. In this regard, the development and implementation of highly efficient biotechnologies based on the use of hydrocarbon-destructive microorganisms to protect the environment is relevant. Since the problem of pollution of natural ecosystems with oil and oil products is extremely acute, in many countries of the world, research is being conducted on the bioremediation of soil and water from these pollutants.

One of the main factors determining the need and method of the remediation approach used is temperature. Depending on the temperature, bacterial activity and the rate of biodegradation may vary seasonally. So one of the main problems of remediation areas in a hot climate is the fact that high temperatures reduce the viscosity of oil and, thus, accelerate its diffusion deep into the soil. Perspective remediation agents for oil-polluted sites in high-temperature regions are thermotolerant microorganisms that are resistant to the lack of water in the soil and the elevated salt content in the soil. Habitats of such microorganisms indicate tolerance to extreme climatic conditions and concentrations of pollutants. The climate of the oil-producing regions of Kazakhstan is characterized as sharply continental with sharp seasonal and daily temperature differences. Therefore, research related to the search and study of thermotolerant microorganisms-destructors of oil is currently very relevant for Kazakhstan.

As a result of the screening of collection cultures of oil-oxidizing microorganisms, 23 cultures were selected, showing good growth in oil at 35°C and 9 cultures at 40°C. From oil-polluted soils of the Western Kazakhstan, 15 isolates were isolated by the method of enrichment cultures at a temperature of 35°C, and 7 were isolated at 40°C. A study of the oxidation of petroleum hydrocarbons by collection cultures at 35°C showed that during their cultivation, oil destruction ranged from 23.7 to 70.5%. At 40°C the loss of oil was in the range of 25-32%.

During the cultivation of newly isolated cultures of thermotolerant microorganisms in a liquid mineral medium with oil, the degree of its destruction at 35°C was 18.7-52.0%, and at 40°C - 22.7-31.5%. A total of 12 of the most promising strains were selected, which can later be used for bioremediation of oil-polluted ecosystems in the summertime under conditions of arid climate.

ПОДГОТОВКА ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ КАДРОВ В ОБЛАСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ

TRAINING OF HIGHLY QUALIFIED SPECIALISTS IN BIOTECHNOLOGY

1. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ И БИОЭТИКА, Нетёсов С.В.	618
BIOTECHNOLOGY EDUCATION AND BIOETHICS, S. V. Netesov	619
2. МНОГОЛЕТНИЙ ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ СОЧИНСКОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ В ПРОЦЕССЕ ПРЕПОДАВАНИЯ ДИСЦИПЛИН БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ, Рыбалко А.А., Рыбалко А.Е.	620
LONG-TERM EXPERIENCE OF RESEARCH OF BIOTECHNOLOGY OF PLANTS OF THE SOCHI BLACK SEA COAST THE PROCESS OF TEACHING THE BIOLOGICAL PROFILE DISCIPLINES, A.A. Rybalko, A.E. Rybalko.....	621
3. НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ОРИЕНТИРОВАННОСТЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В ТЮМЕНСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ, Боме Н.А., Королев К.П., Колоколова Н.Н., Вайсфельд Л.И.	622
SCIENTIFIC RESEARCH ORIENTATION OF BIOTECHNOLOGICAL EDUCATION AT TYUMEN STATE UNIVERSITY, Bome N.A., Koroleov K.P., Kolokolova N.N., Weisfeld L.I.	623
4. ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОВРЕМЕННОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СРЕДЫ ПРИ ПОДГОТОВКЕ БИОТЕХНОЛОГОВ В ТУЛЬСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ, Понаморева О.Н.	624
EXPERIENCE IN THE USE OF MODERN INFORMATION ENVIRONMENT IN BIOTECHNOLOGY EDUCATION AT TULA STATE UNIVERSITY, Ponomareva O.N.	625
5. ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ ЭКСПЕРТА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОЦЕДУРЫ АККРЕДИТАЦИИ ВУЗОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, М.Г. Сульман, Э.М. Сульман, Г.Н. Демиденко	626
WORK FEATURES OF THE EXPERT DURING THE PROCEDURE ACCREDITATION OF HIGHER EDUCATION INSTITUTIONS IN THE RUSSIAN FEDERATION, M.G. Sulman, E.M. Sulman, G.N. Demidenko	627
6. ОПЫТ РАЗРАБОТКИ МЕЖДУНАРОДНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО РЕСУРСА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ В ОБЛАСТИ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ, Базарнова Ю.Г., Аронова Е.Б., Борисенкова А.А., Шляго Ю.И.	628
EXPERIENCE OF DEVELOPING INTERNATIONAL EDUCATIONAL RESOURCE TO IMPROVE THE QUALIFICATION OF FOOD SAFETY SPECIALISTS, Bazarnova Yu. G., Aronova E.B., Borisenkova A.A., Shlyago Yu.I.	629
7. ПРОБЛЕМА ПОПУЛЯРИЗАЦИИ СПЕЦИАЛЬНОСТИ 19.03.01 БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ АБИТУРИЕНТОВ, Мальцевская Н.В., Комарова Е.В., Рупасов С.В.	630
THE PROBLEM OF POPULARIZATION OF SPECIALTY 19.03.01 BIOTECHNOLOGY FOR UNIVERSITY ENTRANTS, Maltsevskaya N.V., Komarova E.V., Rupasov S.V.	631
8. ПРОЕКТ ПРОФИЛЯ "ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ" В СОСТАВЕ ПРИМЕРНОЙ ОСНОВНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПО ОП ВО 19.03.01 "БИОТЕХНОЛОГИЯ" В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ ФГОС 3++, Мезенова О.Я., Агафонова С.В.	632
THE PROJECT OF THE FOOD BIOTECHNOLOGY PROFILE AS A PART OF THE APPROXIMATE MAIN EDUCATIONAL PROGRAM 19.03.01 "BIOTECHNOLOGY" ACCORDING TO REQUIREMENTS OF FGOS 3++, Mezenova O.J., Agafonova S.V.	632
9. ПРОЕКТНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ - ОСНОВА РАЗВИТИЯ "HARD & SOFT SKILLS", Рождественская Л.Н.	633
PROJECT ACTIVITY AS A BASIS FOR DEVELOPING "hard & soft skills", Rozhdestvenskaya L.N.	634
10. СОВРЕМЕННЫЕ ВЫЗОВЫ В ПОДГОТОВКЕ БИОТЕХНОЛОГОВ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ, Пятигорская Н.В., Беляев В.В., Шабалина М.М.	635
CONTEMPORARY CHALLENGES IN THE TRAINING OF BIOTECHNOLOGISTS FOR THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY, Pyatigorskaya N.V., Belyaev V.V., Shabalina M.M.	636
11. СПЕЦИФИКА ПРОЕКТИРОВАНИЯ ПРИМЕРНЫХ ОСНОВНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПРОФИЛЕЙ ПО НАПРАВЛЕНИЮ ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, Титова И.М.	637
SPECIFICITY OF DESIGNING OF EXEMPLARY MAIN EDUCATIONAL PROGRAMS OF PROFILES FOR DIRECTION ANIMAL FOOD PRODUCTS, Titova I.M.	638

УДК 578.5

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ И БИОЭТИКА

Нетёсов С.В.

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2, оф.232А,
e-mail: svn15@hotmail.com

Представлены примеры реальных этических проблем биотехнологической отрасли и обоснована необходимость включения их обсуждения в образовательные программы.

Ключевые слова: биоэтика, биотехнология, биотехнологическое образование, биоэтическое образование

Биотехнология сегодня - это бурно развивающаяся отрасль науки и технологии. В перспективе биотехнологии войдут практически во все отрасли промышленности: от сельскохозяйственной, пищевой и медицинской, где они уже завоевали значительные ниши, до энергетики, обогащения руд, рыбоводства и нанотехнологий.

Такое стремительное развитие неизбежно сопровождается появлением неожиданных проблем и задач, причем далеко не только чисто технических. Вот примеры:

1. Сразу после создания первого генно-инженерного бактериального штамма ведущие специалисты мира были глубоко озабочены возможными негативными последствиями этого и решили обсудить меры их предотвращения. Это обсуждение прошло в виде Асиломарской конференции в Калифорнии, США в 1973 году, где были высказаны серьезные сомнения по поводу безопасности технологий рекомбинантных ДНК. Было решено учитывать все возникающие при этом проблемы: этические, политические, экономические и социальные. И до всестороннего обсуждения этого был наложен временный мораторий на некоторые исследования в области генной инженерии до разработки специальных правил работы с рекомбинантными микроорганизмами. В результате был разработан подробный свод правил по применению генной инженерии в лабораторной и производственной практике, который впоследствии многократно совершенствовался и дополнялся.

2. В 1989-1990 годах в США было выявлено резкое увеличение встречаемости синдрома эозинофилии-миалгии (СЭМ). Это – вообще-то редкое заболевание с тяжелыми мышечными болями и может закончиться смертью больного из-за спазма дыхательных путей. Большинство из пациентов в значительном количестве употребляли пищевую добавку с триптофаном. И каждый раз триптофан был одной и той же фирмы, что было удивительно, поскольку раньше на триптофан этой фирмы рекламаций не было. Выяснилось, что все партии «некачественного» триптофана были получены генно-инженерным путем, но штамм последних партий был другим – суперпродуцентом, хотя ген был таким же точно. Изменилась лишь одна из стадий его очистки, хотя все контрольные тесты на качество остались теми же и давали тот же результат. Как показали анализы последнего продукта, там содержались в небольшом количестве метаболиты триптофана, в том числе 1-1'-этилен-бис-[триптофан] (ЭБТ). Анализ на токсичность выявил, что ЭБТ и вызывает этот синдром. Но оказалось, что и штамм этих же бактерий дикого типа также содержит ЭБТ. Более того, выяснилось, что избыток самого триптофана вызывает этот синдром тоже, хотя и в меньшей степени. В результате, сам L-триптофан был на время запрещен в США в качестве пищевой добавки.

3. В 1930-х годах было показано, что введение природного бычьего соматотропина (БСТ) коровам сильно повышает их удои. Широкого применения в сельском хозяйстве тогда это не нашло из-за немалой цены натурального гормона. Однако, в 1970-х годах БСТ-ген был клонирован в *E.coli*, а рекомбинантный белок был выделен и тестирован. Как и ожидалось, он действовал на коров так же, как и природный (удойность увеличилась на 30%). Рекомбинантный БСТ был тщательно проверен, его содержание в молоке тоже, сам БСТ оказался неактивен для людей. FDA пришла к выводу, что как мясо, так и молоко коров, получавших рек-БСТ, безопасны для человека. Однако одна мощная лоббирующая промышленная группа США заблокировала выдачу разрешения FDA. У этой группы было много доводов, не все они были научной природы, но они все были проверены. В результате только в 1994 году Консультативный комитет по ветеринарии FDA дал разрешение на его применение в молочной индустрии. Во многих других странах, однако, рек-БСТ так и не разрешен. По всей видимости этот запрет обусловлен социально-экономическими причинами, а не обеспокоенностью за здоровье употребляющих это молоко и мясо людей.

В России сейчас проводится много генно-инженерных и биотехнологических разработок, ряд из них является пионерскими. При этом биоэтические проблемы зачастую игнорируются, поскольку разработчики с ними либо вообще не знакомы, либо знают о них весьма поверхностно. Поэтому в имеющиеся

образовательные программы по биотехнологии необходимо включить модули по рассмотрению биоэтических проблем. Такой модуль недавно включен в магистерскую программу по биотехнологии у нас в Новосибирском государственном университете и вызывает значительный интерес у студентов. По всей видимости такие модули стоит включить и в программы последипломного биотехнологического образования.

UDC 578.5

BIOTECHNOLOGY EDUCATION AND BIOETHICS

Sergey V. Netesov

*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Pirogov St., 2, office 232A,
e-mail: svn15@hotmail.com*

Представлены примеры реальных этических проблем биотехнологической отрасли и обоснована необходимость включения их обсуждения в образовательные программы. The examples of some real bioethical problems in biotechnology are presented, and the need of the presence of its bioethical explanation and solution in the modern educational programs in biotechnology is discussed.

Key words: biotechnology, bioethics, biotechnology education, bioethical education

The biotechnology today is a fast developing area of technology and science. In perspective the biotechnology applications will be extended in the main existing areas of industry – from agricultural, food procession and medical, where these technologies are already widely implemented, to biofuel production, ore concentration, fish and seafood production and nanobiotechnology.

Such a rapid development is inevitably accompanied by the appearance of unexpected problems and tasks, and far from purely technical ones. Here are some examples:

1. Immediately after the creation of the first genetically engineered bacterial strain, the world's leading experts were deeply concerned about the possible negative consequences of this and decided to discuss measures to prevent them. This discussion took place in the form of the Asilomar Conference in California, USA in 1973, where serious doubts were expressed about the safety of recombinant DNA technologies. It was decided to take into account all the problems arising from this: ethical, political, economic and social. And prior to a comprehensive discussion of this, a temporary moratorium was imposed on some research in the field of genetic engineering before the development of special rules for working with recombinant microorganisms. As a result, a detailed set of rules on the use of genetic engineering in laboratory and industrial practice has been developed, which was subsequently repeatedly improved and supplemented.

2. In the years 1989-1990, a sharp increase in the incidence of eosinophilia-myalgia syndrome (SEM) had been detected in the United States. This is actually a rare disease with severe muscle pain and can result in the death of a patient due to spasm of the respiratory tract. Most of the patients consumed a significant amount of a dietary supplement with tryptophan. And each time the tryptophan was the same company, which was surprising, since there had been no claims to this company's tryptophan before. It turned out that all batches of "poor quality" tryptophan were obtained by genetic engineering, but the strain of the last batches was different - superproducent, although the gene was the same. Only one of the stages of its purification has changed, although all the quality control tests remained the same and gave the same result. As shown by the analyzes of the latter product, a small amount of tryptophan metabolites were contained there, including 1-1'-ethylene-bis- [tryptophan} (EBT). An analysis of toxicity revealed that EBT causes this syndrome. But it turned out that the strain of the same wild-type bacteria also contains EBT. Moreover, it turned out that an excess of tryptophan itself causes this syndrome, too, although to a lesser extent. As a result, L-tryptophan itself was temporarily banned in the United States as a food additive.

3. In the 1930s, it was shown that the injection of natural bovine somatotropin (BST) solution to cows substantially increases their milk yield. This preparation was not widely used in agriculture because of the considerable price of the natural hormone. However, in the 1970s, the BLN gene had been cloned into *E. coli*, and the recombinant protein was isolated and tested. As expected, he acted on cows in the same way as natural cows (yield increased by 30%). The recombinant BST (rec-BST) was carefully checked, its content in milk too, BST itself turned out to be inactive for humans. The FDA concluded that both the meat and the milk of cows that received rec-BST are safe for humans. However, one powerful US lobbying industry group blocked the issuance of an FDA approval. This group had many arguments, not all of them were of a scientific nature, but they were all thoroughly checked. As a result, it was not until 1994 that the FDA Veterinary Advisory Committee authorized its use in the dairy industry. In many other

countries, however, the rec-BST is still not permitted for use in cows. Apparently, this ban is due to socio-economic reasons, and not concern for the health of people who use these milk and meat.

A lot of genetic engineering and biotechnological R&D projects are being carried out in Russia, some of which are pioneering. In this case, bioethical problems are often ignored, because the developers are either not familiar with them at all, or they know very superficially about them. Therefore, modules on bioethical issues should be included in the existing educational programs. Such a module has recently been included in one of the lecture courses of the master's program in biotechnology in our Novosibirsk State University and is of considerable interest among students. Apparently, such modules should be included in the programs of postgraduate biotechnological education in Russia.

МНОГОЛЕТНИЙ ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЙ BIOTEKHOLOGII PACTEHИЙ COЧИНСКОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ В ПРОЦЕССЕ ПРЕПОДАВАНИЯ ДИСЦИПЛИН БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

Рыбалко А.А., Рыбалко А.Е.

Сочинский институт Российского университета дружбы народов, 354340, г. Сочи, ул. Куйбышева, 32
e-mail: sfrudn@rambler.ru

Разработана технология микроразмножения широкого ассортимента видов растений Сочинского Причерноморья различных семейств. Главным образом яснотковых, горечавковых, зверобойных, гвоздичных, лилейных, первоцветных и др. с применением основных унифицированных приемов, что обеспечивает режим экономии. разработанный метод позволяет достигнуть высокого коэффициента размножения. Так, для мяты водной, важного представителя семейства яснотковых, имеющего значение как пищевое, орнаментальное и фармацевтическое растение коэффициент размножения в течение месяца составил около 1:20. Обосновано применение новых технологических приемов: кондиционирование состава спектра освещения при выращивании микрорастений, применение магнитного поля при проращивании семян и выращивании проросточных культур

Ключевые слова: биоразнообразие, микрорастения, мята водная, магнитное поле, спектр,

Многолетний опыт работы кафедры физиологии (1) Сочинского института (филиала) Российского университета дружбы народов в области системы биотехнологического образования подтверждает, что приобретение теоретических знаний в профессионально-предметной области, доведенных до хорошо сформированных умений в процессе обучения позволяет студентам активно участвовать в научных исследованиях под руководством опытных профессионалов и учёных. Привлечение студентов к участию в научно-исследовательской деятельности следует рассматривать как способ развития творческих способностей, когда учебно-воспитательный процесс предполагает профессиональную подготовку будущего специалиста, его мотивацию на будущую профессию, выявляет и развивает способность и интерес к избранной профессии.

В Сочинском институте РУДН для расширения и углубления изучения основ биотехнологии студентами используются современные методы биотехнологии и молекулярной биологии. Важным направлением в повышении квалификационных характеристик выпускаемых специалистов является участие в различных научно-практических конференциях. Так, с студенты принимали участие в работе постерных сессий конкурса молодых ученых Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» в 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016 и 2017 гг. Доклады студентов были посвящены актуальной проблеме изучения биоразнообразия Сочинского Причерноморья в плане его сохранения и внедрения в народное хозяйство. Результаты наших исследований позволили создать банка исходного материала необходимых генотипов в культуре *in vitro*. Высокий коэффициент размножения в короткие сроки показывают возможность получения больших партий однородного посадочного материала для создания производственных насаждений фармацевтического, пищевого и орнаментально назначения, а также создания ландшафтных конструкций нового поколения. Отметим, что указанная работа несет в себе большой коммерческий потенциал и имеет значение в импортозамещении и возможности межрегиональных и международных поставок уникальной продукции, что соответствует требованиям современного менеджмента: наиболее оптимальным образом соединить тех кто ищет новые знания с теми кто ими владеет.

Литература:

1. Пригородные леса Сочи как естественная лаборатория для обучения студентов биологических специальностей сочинского института РУДН. «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (Москва, 15-17 марта, 2016 г.) М: ЗАО «Экспо-биохимтехнологии», с. 63-64.

LONG-TERM EXPERIENCE OF RESEARCH OF BIOTECHNOLOGY OF PLANTS OF THE SOCHI BLACK SEA COAST THE PROCESS OF TEACHING THE BIOLOGICAL PROFILE DISCIPLINES

A.A. Rybalko, A.E. Rybalko

*Sochi Institute of Peoples' Friendship University of Russia, 354340, Sochi, ul. Kuibyshev, 32
e-mail: sfrudn@rambler.ru*

A technology has been developed for the micropropagation of a wide range of plant species from the Sochi Black Sea coast of various families. Mainly Lamiaceae, Gentiaaceae, Hypericaceae, Cariophyllaceae, Lyliaceae, Primulaceae, etc. with the use of basic unified techniques that provides a saving mode. The developed method allows to achieve a high breeding rate. So, for the *Mentha aquatica*, an important representative of the family Lamiaceae, having value as a food, ornamental and pharmaceutical plant reproduction rate during the month was about 1:20. The use of new technological methods has been substantiated: conditioning the composition of the spectrum of the light when growing micro plants, applying a magnetic field when germinating seeds and growing test-tube crops.

Key words: biodiversity, micro plants, water mint, magnetic field, spectrum.

Long-term experience of the Department of Physiology (1) of the Sochi Institute (branch) of the Peoples' Friendship University of Russia in the field of the system of biotechnological education confirms that the acquisition of theoretical knowledge in the professional subject area brought to a well-formed skills in the learning process allows students to actively participate in research under the guidance of experienced professionals and scientists. Attracting students to participate in research activities should be considered as a way to develop creative abilities, when the educational process involves professional training of a future specialist, his motivation for a future profession, identifies and develops the ability and interest in his chosen profession.

At the Sochi Institute of the PFR University, modern methods of biotechnology and molecular biology are used to expand and deepen the study of the fundamentals of biotechnology by students. An important direction in improving the qualification characteristics of graduates is participation in various scientific and practical conferences. So, students took part in the poster sessions of the young scientists' competition of the Moscow International Congress "Biotechnology: State and Prospects for Development" in 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016 and 2019. Reports of students were devoted to the actual problem of studying the biodiversity of the Sochi Black Sea coast in terms of its conservation and introduction into the national economy. The results of our research allowed us to create a bank of source material of the necessary genotypes in an in vitro culture. The high multiplication factor in a short time shows the possibility of obtaining large batches of uniform planting material for the creation of industrial plantings for pharmaceutical, food and ornamental purposes, as well as the creation of landscape design of the new generation. Note that this work carries a large commercial potential and is important in import substitution and the possibility of interregional and international supply of unique products that meets the requirements of modern management: the best way to combine those who are looking for new knowledge with those who own them.

Reperences:

1. Sochi suburban forests as a natural laboratory for teaching students of biological specialties of the Sochi Institute of PFUR. "Biotechnologies in the complex development of regions" (Moscow, March 15-17, 2016) М: ЗАО "Expo-biochemistry technology", p. 63-64.

УДК 573.6.086.83:372.8

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ОРИЕНТИРОВАННОСТЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В ТЮМЕНСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

Боме Н.А.¹, Королев К.П.¹, Колоколова Н.Н.¹, Вайсфельд Л.И.²¹Тюменский государственный университет, ул. Володарского, д. 6., Тюмень, 625003, Россияe-mail: bomena@mail.ru²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, д. 4. Москва, 119334, Россия

Особенностью магистерской программы «Биотехнология», реализуемой в Институте биологии Тюменского государственного университета, является использование проектно-исследовательских методов в процессе обучения. Достигнуты положительные результаты в рамках сотрудничества с российскими и зарубежными научными центрами.

Ключевые слова: биотехнология, современные методы, магистратура, аспирантура.

Для повышения качества жизни необходимы инновационные разработки по созданию полезного для здоровья человека питания, обеспечивающих сбалансированность, безопасность и разнообразие по функциональному назначению продуктов, что особенно важно для северных регионов.

Получение знаний по этим вопросам обеспечивает магистерская программа «Биотехнология» (06.04.01 Биология), реализуемая на базе Института биологии Тюменского государственного университета. Учебные курсы: Биотехнология в селекции растений, Концепция генетических банков растительных ресурсов, Современные технологии изучения и сохранения генетических ресурсов, Способы размножения растений *in vitro* посвящены изучению генетического разнообразия культурных растений, как основного инструмента продовольственной безопасности. Программа систематизирует и внедряет в учебный процесс многолетний опыт преподавания и научно-исследовательской работы профессорско-преподавательского состава, аспирантов и студентов. Обучение основано на разработке студентами собственных решений в ходе дискуссий или на библиографической и исследовательской основе, а также при апробации результатов.

Магистранты осваивают международные стандарты хранения зародышевой плазмы, стратегии безопасного дублирования коллекций; новые методы тестирования семян; микроскопию и микрофотографию; моделирование стресс-факторов и воздействие их на растения; идентификацию возбудителей болезней; методологию лабораторных и полевых экспериментов, методы количественного анализа генетического разнообразия. Дисциплины сопровождаются учебно-методическими комплексами, оценочной базой, программными ресурсами: Statistica, SDADIA, Stochastic Modeling and Statistical Data Processing Techniques. Основная цель обучения - подготовка качественно новых специалистов, мыслящих в новых категориях, владеющих теоретическими знаниями и практическими навыками работы на современном оборудовании, умеющих интерпретировать научную, экономическую и социальную информацию в контексте преподаваемых дисциплин и способных отвечать на современные вызовы в области сельскохозяйственной биотехнологии.

Это стало основанием для организации совместной работы по подготовке образовательной программы двойных дипломов в магистратуре с Колледжем экологии и лесоведения Университета штата Нью-Йорк (SUNY ESF), США, имеющий образовательный опыт мирового уровня и новейшие исследования в области молекулярной биологии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии. В реализации научно-исследовательских проектов участвуют: Всероссийский институт защиты растений РАН, ведущий центр по разработке молекулярных методов диагностики болезней растений; Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, обеспечивающий методическую поддержку по технологии химического мутагенеза, как инновационного способа получения форм растений с новыми полезными признаками.

Программа магистратуры «Биотехнология» интегрирована с аспирантурой по биологическим наукам 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и подготавливает магистров для дальнейшего обучения и продолжения научно-исследовательской работы. Магистранты и аспиранты для выполнения фундаментальных и прикладных исследований имеют возможность для работы в лабораториях академических (ВИЗР РАН), зарубежных (SUNY ESF, США) и региональных (Тобольская комплексная научная станция УрО РАН) центрах. Программы магистратуры и аспирантуры рассматриваем как вклад в выход Тюменского государственного университета на лидирующие позиции в разработке инновационных программ для региона методами и средствами биотехнологии.

UDK 573.6.086.83:372.8

SCIENTIFIC RESEARCH ORIENTATION OF BIOTECHNOLOGICAL EDUCATION AT TYUMEN STATE UNIVERSITY

Bome N.A.¹, Koroleov K.P.¹, Kolokolova N.N.¹, Weisfeld L.I.²

¹Tyumen State University, Volodarskogo St., 6, Tyumen, 625003, Russia
e-mail: bomena@mail.ru

²N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Kosygin St., 4. Moscow, 119334, Russia

A special feature of the master's program "Biotechnology", implemented at the Institute of Biology of Tyumen State University, is the use of design and research methods in the learning process. Positive results have been achieved in the framework of cooperation with Russian and foreign research centers.

Key words: biotechnology, modern methods, magistracy, graduate school

To improve the quality of life of the population, innovative developments are needed to ensure balance, safety and diversity of products, which is especially important for the northern regions. Obtaining knowledge on these issues is provided by the Master's program "Biotechnology" (04.06.01 Biology), implemented on the basis of the Institute of Biology of Tyumen State University. Training courses: Biotechnology in plant breeding, Concept of genetic banks of plant resources, Modern technologies of studying and preserving genetic resources, Methods of plant reproduction in vitro are devoted to the study of the genetic diversity of cultivated plants as the main tool of food security. The program organizes and introduces in the educational process many years of experience in teaching and research work of the faculty, graduate students and students. The training is based on the development by students of their own decisions during discussions or on a bibliographic and research basis, as well as in testing the results.

Undergraduates are considering international standards for germplasm storage, strategies for the safe duplication of collections; new seed testing methods; microscopy and micrograph; modeling of stress factors and their effects on plants; identification of pathogenic microorganisms; methodology of laboratory and field experiments, methods for quantitative analysis of genetic diversity.

Disciplines are accompanied by educational and methodological complexes, evaluation base, software resources: Statistica, SDADIA, Stochastic Modeling and Statistical Data Processing Techniques. The main goal of the training is to prepare qualitatively new specialists who think in new categories, possess theoretical knowledge and practical skills of working on modern equipment, who can interpret scientific, economic and social information in the context of the taught disciplines and are able to respond to modern challenges in agricultural biotechnology.

This became the basis for the organization of joint work on the preparation of the educational program of double degrees in the master's program with the College of Ecology and Forest Studies of the University of New York (SUNY ESF), USA, which has world-class educational experience and the latest research in the field of molecular biology, transmission and scanning electron microscopy. In the implementation of research projects are involved: All-Russian Institute for Plant Protection RAS, a leading center for the development of molecular methods for the diagnosis of plant diseases; N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, which provides methodological support for the technology of chemical mutagenesis, as an innovative way to obtain plant forms with new useful features.

The Master's program "Biotechnology" is integrated with the post-graduate program in biological sciences 03.01.06 Biotechnology (including bionanotechnology) and prepares masters for further education and continuation of research work. Undergraduates and graduate students to perform basic and applied research have the opportunity to work in academic laboratories (VIZR RAS), foreign (SUNY ESF, USA) and regional (Tobolsk integrated scientific station URO RAS) centers. We consider magistracy and postgraduate programs as a contribution to the emergence of Tyumen State University on leading positions at the development of innovative programs for the region using methods and means of biotechnology.

УДК 378+504.6

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОВРЕМЕННОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СРЕДЫ ПРИ ПОДГОТОВКЕ BIOTEKHOLOGОВ В ТУЛЬСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

Понаморева О.Н.

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия.

300012, Тула, проспект Ленина, 92.

e-mail: olgaponamoreva@mail.ru

Биотехнология, одна из самых инновационных сфер деятельности человека, развивается стремительно во всем мире. Умение использовать возможности современной информационной среды является необходимым условием при подготовке квалифицированных специалистов в области биотехнологии.

Ключевые слова: высшее образование, подготовка научных и педагогических кадров, биотехнология, научная информационная среда

Современные темпы развития биотехнологий не могут не впечатлять. По оценкам экспертов, мировой рынок биотехнологий в 2025 г. достигнет уровня в 2 триллиона долларов США, темпы роста по отдельным сегментам рынка колеблются от 5-7 до 30% ежегодно [1]. Основными сферами использования биотехнологий являются: медицина и фармацевтика, сельское хозяйство, промышленное производство, энергетика и охрана окружающей среды. Центрами развития биотехнологий считаются США, Германия, Франция, Дания, Швейцария, Швеция. Ко второму эшелону можно отнести Японию, Южную Корею, Австралию и Канаду. Активно подбираются к лидерам Китай и Индия. В тоже время, доля российского участия в глобальном процессе оценивается всего в 0,1%, несмотря на значительный научный потенциал [2]. Главным тормозом отрасли на протяжении уже многих лет являются многочисленные бюрократические преграды на пути продукта к потребителю. Это является одной из причин низкой востребованности выпускников биотехнологов в народном хозяйстве нашей страны, но они находят применение своим знаниям и умениям в научно-исследовательских институтах или инновационных компаниях. Таким образом, основным видом деятельности, к которой готовятся выпускники университета по направлению подготовки – биотехнология, является научно-исследовательская деятельность, что предполагает формирование у выпускников компетенций, связанных анализом научно-технической информации по биотехнологии с использованием специализированных баз данных, прежде всего зарубежных, как отмечалось выше. В рамках дисциплин «Информационные базы данных по биотехнологии» и «Новые информационные технологии» студенты получают знания и навыки, необходимые им в научной деятельности. С самого начала обучения биотехнологов в ТулГУ заложены высокие критерии подготовки современных специалистов. Обязательными формами подготовки студентов является выполнение экспериментальных курсовых работ, исследовательских выпускных квалификационных работ, индивидуальных заданий по практикам, магистерских диссертаций в научных лабораториях ТулГУ и научно-исследовательских институтов ПНЦ РАН. На каждом этапе обучения они получают знания и опыт в организации и проведении научно-исследовательской работы, в том числе по поиску и анализу научных источников. С первых курсов студенты представляют полученные результаты к публичной защите и выступают на конференциях, используя современные информационные технологии для подготовки докладов. Важная роль в этом направлении принадлежит всероссийской молодежной конференции с элементами научной школы «Экотоксикология», которая проводится на базе ТулГУ ежегодно. На старших курсах бакалавриата они учатся использовать программу управления библиографической информации «Mendeley», проводить поиск научной информации на сайте биотехнологического центра NCBI, в реферативной базе данных Scopus, полнотекстовый поиск научных статей в ScienceDirect. Магистранты знакомятся с возможностями общения в научных социальных сетях (Research Gate), структурными элементами научной статьи и электронными технологиями подачи рукописи в журнал.

Литература:

1. Рынок биотехнологий в России: анализ и перспективы развития. // Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики». <https://www.hse.ru/org/hse/expert/industrial/bio> (дата обращения: 14.01.2019).
2. Информационно-аналитическое агентство «Деловые новости». 17 марта 2017. <http://delonovosti.ru/business/3874-razvitie-biotehnologiy-v-rossii.html> (дата обращения: 14.01.2019).

UDC 378+504.6

EXPERIENCE IN THE USE OF MODERN INFORMATION ENVIRONMENT IN BIOTECHNOLOGY EDUCATION AT TULA STATE UNIVERSITY

Ponamoreva O.N.

*Tula State University, Tula, Russia.
300012, Tula, Lenin's Ave., 92.
e-mail: olgaponamoreva@mail.ru*

Biotechnology, one of the most innovative areas of human activity, is developing rapidly around the world. The ability to use the capabilities of the modern information environment is a prerequisite for the training of qualified specialists in the field of biotechnology.

Key words: higher education, training of scientific and pedagogical staff, biotechnology, scientific information environment

The current pace of development of biotechnology can't fail to impress. According to experts, the world biotechnology market in 2025 will reach the level of 2 trillion US dollars, the growth rate for individual market segments range from 5-7 to 30% annually [1]. The main areas of biotechnology are medicine and pharmaceuticals, agriculture, industrial production, energy and environmental protection. Centers for the development of biotechnology are the United States, Germany, France, Denmark, Switzerland, Sweden. Japan, South Korea, Australia and Canada can be attributed to the second echelon. China and India are actively picking up the leaders. At the same time, the share of Russian participation in the global process is estimated at only 0.1%, despite the significant scientific potential [2]. The main brake on biotechnology industry for many years now has been numerous bureaucratic obstacles to the product's path to the consumer. This is one of the reasons for the low demand for biotechnology graduates in the national economy of our country, but they find application of their knowledge and skills in research institutes or innovative companies. Thus, the main activity of graduates of biotechnology is research. This implies the need to form competences related to the analysis of scientific information on biotechnology using specialized databases, primarily foreign ones, as noted above. Students receive the knowledge and skills they need in research activities when studying the disciplines "Information databases on biotechnology" and "New information technologies." High criteria for the modern biotechnologists laid from the beginning of education in TSU. Indispensable forms of student training are experimental research, research final qualifying works, and individual tasks in practice, master's theses, which must be performed in research laboratories of TSU and research institutes of the PSC RAS. They gain knowledge and experience in organizing and conducting research, including searching and analyzing scientific sources. From the first courses, students present the research results for public protection and speak at conferences using modern information technology to prepare reports. An important role in this direction belongs to the annual conference with elements of the scientific school "Ecotoxicology" on the basis of TSU. Students learn to use the Mendeley bibliographic information management program, conduct scientific search on the NCBI biotechnology center, in the Scopus abstract database, full-text search for ScienceDirect scientific articles. Undergraduates get acquainted with the possibilities of communication in scientific social networks (Research Gate), the structural elements of a scientific article and electronic technologies for submitting a manuscript to the journal.

References:

1. *The biotechnology market in Russia: analysis and development prospects.* // National Research University Higher School of Economics. <https://www.hse.ru/org/hse/expert/industrial/bio> (access date: 01.01.2019).
2. *Information and analytical agency "Business News".* March 17, 2017. <http://delonovosti.ru/business/3874-razvitie-biotehnologii-v-rossii.html> (access date: 01/14/2019).

УДК 378.14

ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ ЭКСПЕРТА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОЦЕДУРЫ АККРЕДИТАЦИИ ВУЗОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Государственная аккредитация образовательной деятельности вузов с целью подтверждения соответствия ФГОС образовательной деятельности по основным образовательным программам и подготовки обучающихся осуществляется экспертной группой в рамках деятельности Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки.

Ключевые слова: аккредитация, эксперт, высшее образование.

Процедура аккредитации, основные положения которой закреплены в ряде федеральных законов и подзаконных актов, является одной из форм государственного контроля за деятельностью высших учебных заведений России. Несмотря на различия в статусе, структуре, направлениях подготовки и форме собственности вузов, порядок проведения аккредитации един для всех, и в настоящее время проводится раз в шесть лет, за исключением аккредитации нового для учебного заведения направления подготовки.

Предметом аккредитационной экспертизы является определение соответствия содержания и качества подготовки обучающихся, по заявленным для государственной аккредитации основным образовательным программам (ООП).

В проведении аккредитационной экспертизы участвуют аккредитованные эксперты, имеющие необходимую квалификацию в области заявленных вузом для государственной аккредитации ООП. В состав экспертной группы входят: руководитель, который определяется в соответствии с профессиональными и личностными компетенциями, и аккредитованные эксперты, профессиональные компетенции которых соответствуют направлению подготовки (специальности) по ООП, заявленным на государственную аккредитацию.

К участию в аккредитационной экспертизе могут быть привлечены:

- экспертные организации, соответствующие установленным требованиям;
- аккредитованный международный эксперт;
- представитель экспертной организации в качестве эксперта-работодателя, профессиональная область которого соответствует направлению подготовки (специальности) по ООП, заявленным на государственную аккредитацию. Эксперт-работодатель принимает участие в оценке сформированности компетенций обучающихся ООП и в процедурах анкетирования представителей работодателей, участвующих в разработке ООП;
- представитель экспертной организации – студент, участвующий в процедурах анкетирования обучающихся.

Аккредитационная экспертиза содержания и качества подготовки обучающихся ООП проводится с выездом и без выезда экспертной группы в образовательное учреждение.

В обязанности эксперта входит:

- предварительный анализ материалов и подготовка к проведению аккредитационной экспертизы;
- принятие участия в совещаниях экспертной группы;
- установление наличия контингента обучающихся по ООП;
- определение соответствия содержания подготовки обучающихся (учебного плана, календарного учебного графика, рабочих программ дисциплин (модулей), программ практик, оценочных средств, методических материалов) и условий реализации ООП требованиям ФГОС;
- определение соответствия качества подготовки обучающихся, оценка степени достижения планируемых результатов освоения ООП и (или) планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю), практике;
- формирование и предоставление руководителю экспертной группы отчета об аккредитационной экспертизе по каждой заявленной ООП, характеристику содержания и качества подготовки обучающихся по каждой ООП, а также заверенные вузом, копии документов, подтверждающих несоответствия требованиям ФГОС, выявленные экспертом (при их наличии);
- размещение скан-копий документов в личном кабинете.

UDC 378.14

WORK FEATURES OF THE EXPERT DURING THE PROCEDURE ACCREDITATION OF HIGHER EDUCATION INSTITUTIONS IN THE RUSSIAN FEDERATION

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*

State accreditation of educational activities of universities is carried out by an expert group in the framework of the Federal service for supervision of education and science in order to confirm the compliance of the FSES educational activities on basic educational programs and training of students.

Key words: accreditation, expert, higher education.

The accreditation procedure, the main provisions of which are enshrined in a number of Federal laws and regulations, is one of the forms of state control over the activities of higher education institutions in Russia. Despite the differences in the status, structure, directions of training and form of ownership of universities, the procedure for accreditation is the same for all and is currently held every six years, except for the accreditation of the new direction of training for the institution.

The subject of the accreditation examination is to determine the compliance of the content and quality of training of students, according to the main educational programs (MEP) declared for the state accreditation.

Accredited experts with the necessary qualifications in the field of the MEP declared by the University for state accreditation participate in the accreditation examination. The composition of the expert group includes the head, which is determined in accordance with professional and personal competencies, and accredited experts, professional competencies of which correspond to the direction of training (specialty) in the MEP, declared for state accreditation.

To take part in the accreditation expertise, the following participants may be involved:

- expert organizations that meet the established requirements;
- the accredited international expert;
- the representative of the expert organization as the expert-employer which professional area corresponds to the direction of preparation (specialty) on MEP declared on the state accreditation. The expert-employer takes part in the assessment of the formation of competencies of students of the MEP and in the questionnaire procedures of employers representatives involved in the development of the MEP;
- the representative of the expert organization – the student participating in procedures of questioning of the trained.

Accreditation examination of the content and quality of training of students on MEP is carried out in the form of on-site and out-site work of the expert group in an educational institution.

The duties of the expert include:

- preliminary analysis of materials and the preparation for the accreditation expertise;
- participation in expert group meetings;
- establishing the presence of a contingent of students trained on MEP;
- determination of compliance of the content of students training (curriculum, schedule, work programs of disciplines (modules), programs of practices, evaluation tools, teaching materials) and the conditions for the implementation of the MEP requirements of the FSES;
- determination of the quality of students training, assessment of the planned results achievement degree in the frames of MEP and (or) the planned results of training in the discipline (module), practice;
- generation and submission (to the head of the expert group) of the report on the accreditation expertise for each declared the MEP, the characteristics of the content and quality of preparation of students in each of the MEP and also certified by the University, copies of documents confirming the compliance with the requirements of the FSES identified by the expert (if any);
- uploading of the scanned copies of the documents in the personal Cabinet.

УДК 378.046.4

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ МЕЖДУНАРОДНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО РЕСУРСА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ В ОБЛАСТИ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Базарнова Ю.Г.¹, Аронова Е.Б.¹, Борисенкова А.А.², Шляго Ю.И.²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия, 194021,
Санкт-Петербург, ул. Новороссийская 48
e-mail: aronovae@inbox.ru

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург,
Россия

Разработан международный образовательный ресурс в области контроля качества пищевой продукции и ветеринарной экспертизы пищевого сырья, кормов и готовой пищевой продукции.

Ключевые слова: международный образовательный ресурс, повышение квалификации, контроль качества и безопасности пищевых продуктов

В настоящее время значительное внимание уделяется вопросам контроля качества пищевой продукции и ветеринарно-санитарной экспертизы пищевого сырья, кормов и готовой продукции, т.к. безопасность продуктов питания – насущная проблема современного общества [1]. Важным фактором, обеспечивающим эффективное решение указанных задач, является подготовка высококвалифицированных кадров. Учитывая актуальность этой сферы деятельности, по заданию Фонда инфраструктурных и образовательных программ (Группа РОСНАНО), разработан международный образовательный ресурс, представляющий собой совокупность учебных модулей и учебно-методических материалов, учитывающих специфику агропромышленного комплекса стран-членов ЕАЭС и предназначенный для повышения квалификации специалистов.

Ресурс включает 240 часов и состоит из общепрофессионального и профессионального циклов, содержащих 5 учебных модулей и более 20 междисциплинарных курсов, являющихся самостоятельными структурными единицами, которые могут быть предложены слушателям для формирования отдельных профессиональных компетенций.

Достоинство ресурса – модульный принцип построения, позволяющий формировать индивидуальные образовательные траектории. Он ориентирован на целевые группы специалистов в области контроля пищевой продукции и ветеринарно-санитарной экспертизы, в том числе, руководителей испытательных лабораторий и центров контроля качества, ветеринарных врачей, инженеров-микробиологов, специалистов лабораторий ветеринарной диагностики, инженеров-химиков, специалистов лабораторий контроля качества сырья и готовой пищевой продукции.

Ресурс включает следующие модули: классические микробиологические и экспресс-методы исследования для контроля безопасности пищевой продукции, кормов и диагностики болезней животных, вызванных бактериальными агентами; применение технологии радиочастотной идентификации в научно-исследовательских лабораториях; инструментальные методы исследования для контроля безопасности пищевой продукции; выявление генетически модифицированных организмов, их характеристика и методы идентификации в пищевых продуктах; методы и средства радиационного контроля и мониторинга.

Учебный план предполагает как дистанционную форму проведения занятий, которая составляет не менее 60% от общего количества часов, так и аудиторные занятия. Практические занятия проводятся на современном оборудовании от компаний-производителей продукции наноиндустрии, что способствует внедрению инновационных технологий контроля качества и безопасности сырья и готовой пищевой продукции, обеспечивает повышение скорости и точности анализов, позволяет проводить мониторинг качества продукции в полном соответствии с европейскими стандартами качества.

Для наполнения дистанционных модулей разработан контент междисциплинарных курсов, состоящий из теоретического лекционного материала и презентаций, а также учебные и учебно-методические материалы и тестовые задания для промежуточной и итоговой аттестации слушателей. После апробации международного образовательного ресурса при обучении группы слушателей из партнерских организаций стран ЕАЭС в количестве 100 человек будет проведена необходимая доработка и сформулированы предложения по его дальнейшей реализации.

Литература:

1. Решение Комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 №317 «О применении ветеринарно-санитарных мер в таможенном союзе».

UDC 378.046.4

EXPERIENCE OF DEVELOPING INTERNATIONAL EDUCATIONAL RESOURCE TO IMPROVE THE QUALIFICATION OF FOOD SAFETY SPECIALISTS

Bazarnova Yu.G.¹, Aronova E.B.¹, Borisenkova A.A.², Shlyago Yu.^{1,2}

¹Higher School of Biotechnology and Food Technology,
Peter the Great Saint Petersburg State Polytechnical University,
194021, Novorossiyskaya Str., 48-50, St. Petersburg, Russia
e-mail: aronovae@inbox.ru

²Saint Petersburg State Institute of Technology,
190013, Moskovsky Ave, 26, St. Petersburg, Russia

We developed an international educational resource in the field of food quality control and veterinary examination of food raw materials, feed and end food products.

Key words: international educational resource, qualification improvement, food safety and quality control

Currently, considerable attention is paid to quality control of food products and veterinary and sanitary examination of food raw materials, feed and end products, because food safety is a real problem of modern society [1]. An important factor ensuring efficient solution of these tasks is training of highly qualified personnel. Given the relevance of this field of activity, the Fund for Infrastructure and Educational Programs (RUSNANO Group) gave the instructions to develop an international educational resource. The developed resource is a set of training modules and teaching materials that take into account the specifics of agro-industrial complex of the EAEU member countries aimed at improving the skills of specialists.

The resource comprises 240 hours and consists of general professional and professional cycles containing 5 training modules and more than 20 interdisciplinary courses, which are independent structural units that can be offered to students for formation of individual professional competencies.

The dignity of the resource is a modular construction principle, which allows formation of individual educational trajectories. It is focused on target groups of specialists in the field of food products control and veterinary-sanitary examination, including the heads of testing laboratories and quality control centers, veterinarians, microbiological engineers, specialists of veterinary diagnostics laboratories, chemical engineers, and specialists of laboratories for raw material and end food products quality control.

The resource includes the following modules: classical microbiological and express-research methods for monitoring the safety of food products and feed, and diagnostics of animal diseases caused by bacterial agents; application of radio frequency identification technology in research laboratories; instrumental research methods to control the safety of food products; identification of genetically modified organisms, their characteristics and methods of identification in food products; methods and means of radiation control and monitoring.

The curriculum includes both distance form of learning, which is at least 60% of the total number of hours, and in-class learning. Practical classes are held using modern equipment from manufacturers of nanoindustry products. This is helpful for introduction of innovative technologies for control of quality and safety of raw materials and end food products, improves the speed and accuracy of analyzes, allows one to carry out product quality monitoring in total compliance with European quality standards.

The content of interdisciplinary courses, consisting of theoretical lecture material and presentations, as well as teaching and learning aids and test tasks for intermediate and final certification of students, have been developed for distant modules. After approving the international educational resource on a group of students from partner organizations of the EAEU countries in the amount of 100 people we will carry out the necessary improvements and we will make suggestions for its further implementation.

References:

Decision of the Commission of the Customs Union of 18.06.2010 No. 317 "On the application of veterinary and sanitary measures in the Customs Union".

УДК 573.6.086, 37.033, 37.031.4

ПРОБЛЕМА ПОПУЛЯРИЗАЦИИ СПЕЦИАЛЬНОСТИ 19.03.01 БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ АБИТУРИЕНТОВ

Мальцевская Н.В., Комарова Е.В., Рупасов С.В.

Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение города Москвы
«Воробьевы горы» (ГБПОУ «Воробьевы горы») Москва, Россия,
e-mail: maltsevskaya@yandex.ru

Изложены основные проблемы популяризации специальности 19.03.01 «Биотехнология» для абитуриентов и пути их решения.

Ключевые слова: работа с абитуриентами, популяризация биотехнологии.

Важной проблемой при работе с абитуриентами – будущими студентами-биотехнологами – является отсутствие у них понимания, что такое биотехнология и где в будущем может трудоустроиться специалист, успешно завершивший обучение по программам, относящимся к укрупненной группе специальностей 19.00.00 Промышленная экология и биотехнологии в общем и в частности по специальности 19.03.01 Биотехнология.

При выборе направления обучения абитуриенты руководствуются следующими факторами: интерес к специальности, качество обучения в ВУЗе, отсутствие или наличие платы за обучение, местонахождение ВУЗа [1].

В школьном курсе биологии знакомству с такой наукой как биотехнология отводится около 1 – 2 уроков в 8 классе (например, в рамках знакомства с производством вакцин в теме «Иммунитет») и 1 – 2 урока в 9 классе (в рамках темы «Основы селекции растений, животных и микроорганизмов»). Также есть несколько часов, посвященных темам, в которых упоминается биотехнология в 10 и 11 классе в рамках курса биологии и экологии. Важно подчеркнуть, что в 10-11 классе уже идет профилизация, где происходит перераспределение часов на ту или иную группу предметов, выбранную обучающимися. И часть обучающихся, которые могли бы связать свое будущее с таким направлением как биотехнология (инженерной направленности), попросту не знают о такой возможности. Таким образом, крайне необходимо знакомить обучающихся школ с данным направлением обучения не позднее 7-8 класса.

ВУзам необходимо проводить мероприятия по популяризации специальности «Биотехнология» как среди обучающихся, так и среди учителей (причем не только для учителей биолого-химической направленности, но и для физико-математической направленности и т.д.). Важно донести до широкого круга лиц информацию о том, что такое биотехнология. О том, что биотехнология – стыковое направление, объединяющее различные направления науки, такие как физика, математика, биология, экология, инженерные дисциплины [2], [3]. Важно осуществлять и поддерживать программы, посвященные биотехнологии и смежным направлениям науки как в рамках «довузовской» подготовки так и в рамках отдельного дополнительного образования.

Литература:

1. Рыченков М.В., Рыченкова И.В., Киреев В.С. Исследование факторов, оказывающих влияние на выбор вуза абитуриентами, на различных этапах процесса поступления // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6.; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=11612> (дата обращения: 17.01.2019).
2. 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.
3. Мальцевская Н.В., Караскова Н. перспективы популяризации биотехнологического образования в школе в России // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 23 - 25 МАЯ 2018 Г.- Сборник, ООО "РЭД ГРУПП". Москва. 2018. ISBN 978-5-9909118-0-2.

UDC 573.6.086, 37.033, 37.031.4

THE PROBLEM OF POPULARIZATION OF SPECIALTY 19.03.01 BIOTECHNOLOGY FOR UNIVERSITY ENTRANTS

Maltsevskaya N.V.1, Komarova E.V., Rupasov S.V.

State budget professional educational institution of Moscow city "Vorobyovy Gory" (Vorobyovy Gory) Moscow, Russia
e-mail: maltsevskaya@yandex.ru

The main problems of popularization of specialty 19.03.01 "Biotechnology" for entrants and ways of their decision are stated.

Key words: work with university entrants, popularization of biotechnology.

An important problem of working with University entrants – future biotechnology students – lack of understanding of what biotechnology is and where in the future can work a job specialist, have successfully completed programmes relating to the enlarged group of specialties 19.00.00 Industrial ecology and biotechnology in general, and in particular, specialty 19.03.01 Biotechnology.

When choosing the direction of study, applicants guided by the following factors: interest in the specialty, the quality of education at the University, the absence or availability of tuition fees, the location of the University [1].

In the school course of biology acquaintance with such science as biotechnology is given about 1 – 2 lessons in the 8th grade (for example, in the framework of acquaintance with the production of vaccines in the topic "Immunity") and 1 – 2 lessons in the 9th grade (for example, the theme "Basics of selection of plants, animals and microorganisms"). There are also several lessons related with biotechnology topics in the 10th and 11th grades within the course of biology and ecology. It is important to emphasize that in the 10-11 grade is already profiling, where there is a redistribution of hours on a particular group of subjects chosen by students. Some students who could link their future with such a direction as biotechnology (engineering), simply do not know about this possibility. Thus, it is extremely necessary to acquaint the students of schools with this direction of education not later than 7-8 grades.

Universities need to carry out activities to promote the specialty "Biotechnology" both among students and among teachers (not only for teachers of biological and chemical orientation, but also for physical and mathematical orientation, etc.). It is important to communicate to a wide range of people what biotechnology does. The fact that biotechnology is a joint direction uniting various disciplines such as physics, mathematics, biology, ecology, engineering [2], [3]. It is important to implement and support programmes on biotechnology and related areas of science both in pre-University education and in independent supplementary education (out-of-school-hours learning).

References:

1. Rychenkov M. V., Ryzhenkova I. V., Kireev V. S. investigation of the factors influencing the choice of university students, at various stages of the application process // *Modern problems of science and education*. - 2013. - № 6. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=11612> (date accessed: 17.01.2019).
2. Maltsevskaya N. V. School engineering research project in the field of biotechnology in the collection of reports quality management of engineering education. Opportunities of Universities and needs of industry: Abstracts of the second international scientific-practical conference: Moscow, 23-25 June 2016 / Resp. ed. by E. V. Smirnova. – M.: Publishing house of NUK Yiwu MGTU im. N. Uh. Bauman, 2016. – 284-226 pp.
3. Maltsevskaya N.V., Karaskova N. The prospects of promoting biotechnology education in schools in Russia// *Materials of the international forum "Biotechnology: state and prospects of development" MAY 23 - 25, 2018 - Collection, "RED GROUP". Moscow.2018. ISBN 978-5-9909118-0-2.*

УДК 663.1

ПРОЕКТ ПРОФИЛЯ "ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ" В СОСТАВЕ ПРИМЕРНОЙ ОСНОВНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПО ОП ВО 19.03.01 "БИОТЕХНОЛОГИЯ" В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ ФГОС 3++

Мезенова О.Я., Агафонова С.В.

ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия,
236022, Калининград, Советский проспект, 1
e-mail: mezenova@klgtu.ru

Рассмотрены проект примерной основной образовательной программы в части профиля «Пищевая биотехнология» направления 19.03.01 «Биотехнология» в соответствии с требованиями ФГОС 3++ и профессиональных стандартов.

Ключевые слова: ФУМО, образовательные стандарты, образовательные программы

В 2018 г. отделением пищевых технологий и биотехнологии при ФУМО 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии» разработан проект примерной основной образовательной программы (ПООП) по направлению «Биотехнология» в части профиля «Пищевая биотехнология» с учетом требований ФГОС 3++ , макета Минобрнауки и профессиональных стандартов.

ПООП в части профиля «Пищевая биотехнология» представляет собой учебно-методическую документацию, которая включает в себя примерный учебный план, примерный календарный учебный график, примерные рабочие программы учебных предметов, курсов, дисциплин (модулей). В целом ПООП определяет рекомендуемые объем и содержание образования, планируемые результаты освоения образовательной программы, примерные условия образовательной деятельности, включая примерные расчеты нормативных затрат оказания государственных услуг по реализации образовательной программы. ПООП с разработанным профилем является основой для разработки организациями, осуществляющими образовательную деятельность, основных образовательных программ по профилю «Пищевая биотехнология». В данном виде ПООП устанавливает требования к результатам освоения основных образовательных программ: индикаторы достижения универсальных и общепрофессиональных компетенций выпускника (в общей части), обязательные профессиональные компетенции и индикаторы их достижения (в профиле).

UDK 663.1

THE PROJECT OF THE FOOD BIOTECHNOLOGY PROFILE AS A PART OF THE APPROXIMATE MAIN EDUCATIONAL PROGRAM 19.03.01 "BIOTECHNOLOGY" ACCORDING TO REQUIREMENTS OF FGOS 3++

Mezenova O.J., Agafonova S.V.

Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia,
236022, Kaliningrad, Soviet Avenue 1
e-mail: mezenova@klgtu.ru

Are considered the draft of the approximate main educational program regarding the Food Biotechnology profile of the direction 19.03.01 "Biotechnology" according to requirements of FGOS 3++ and professional standards.

Key words: FUMO, educational standards, educational programs

In 2018 the office of food technologies and biotechnologies at FUMO 19.00.00 "Industrial ecology and biotechnologies" developed the draft of the approximate main educational program for the Biotechnology direction regarding the Food Biotechnology profile taking into account requirements of FGOS 3++, the model of the Ministry of Education and Science and professional standards.

The approximate main educational program regarding the Food Biotechnology profile represents educational

and methodical documentation which includes the approximate curriculum, the approximate schedule educational diagram, approximate working programs of subjects, courses, disciplines (modules). In general the approximate main educational program the recommended volume and content of education, the planned results of development of the educational program, approximate conditions of educational activity, including approximate calculations of standard costs of rendering public services for implementation of the educational program. The approximate main educational program with the developed profile is a basis for development by the organizations which are carrying out educational activity, the main educational programs for the Food Biotechnology profile. In this look the approximate main educational program establishes requirements to results of development of the main educational programs: indicators of achievement of universal and all-professional competences of the graduate (in the general part), obligatory professional competences and indicators of their achievement (in a profile).

УДК 378.14:001.81

ПРОЕКТНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ – ОСНОВА РАЗВИТИЯ «HARD & SOFT SKILLS»

Рожественская Л.Н.

Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия
630073, Новосибирск, пр.К. Маркса, д. 20, корп.2
e-mail: lada2006job@mail.ru

При переходе от промышленной экономики к экономике знаний ценность человеческого капитала возрастает. Система подготовки кадров, основанная на формировании твердых навыков постепенно теряет свою актуальность. Особенно значима эта проблема в биотехнологии. Проектная деятельность позволяет не только успешно развивать междисциплинарные компетенции, но и способствует наращиванию твердых и мягких навыков.

Ключевые слова: биотехнология, проектная деятельность, твердые и мягкие навыки

Поскольку биотехнология способствует улучшению качества человеческой жизни, она может стать одним из наиболее динамично развивающихся и прибыльных бизнесов XXI века. «Комплексная программа развития биотехнологий в РФ на период до 2020 года» предполагает активное развитие биоэнергетики, биофармацевтики и биомедицины, промышленной, агро- и пищевой биотехнологий.

Основой для подготовки специалистов, способных к реализации биотехнологических междисциплинарных проектов на всем их жизненном цикле становится проектная деятельность. В период промышленной экономики максимально востребованы были твердые навыки - измеримые и стандартизированные. Однако, сейчас время экономики знаний. Всё меньше видов занятости, где сформированные навыки не будут значительно изменяться с течением времени, а количество коммуникаций будет крайне ограничено [1,2,3]. Биотехнология одно из направлений, где процессы трансформаций стремительны, революция знаний уже позволила автоматизировать множество технических задач, а многие из твердых навыков, быстро становятся неактуальными. Кроме того, в биотехнологических проектах, значительна потребность в выстраивании взаимодействия большого количества междисциплинарных специалистов, зачастую разных национальностей и культур. А это невозможно без опоры на мягкие навыки. Современная совместная деятельность - это общение с другими людьми. Это среда для переговоров, компромиссов и общения. Таким образом, возникает острая необходимость в выстраивании системы образования, которая бы обучала людей соответственно этим потребностям.

Проектная деятельность учащихся - наиболее эффективный способ формирования как внутренних мягких навыков, определяющих отношение к себе (уверенности в себе, самоосознания, милосердия, принятия критики, критического мышления, устойчивости, терпения, управления эмоциями, восприимчивости и мышления, направленного на рост), так и внешних мягких навыков, отвечающих за взаимоотношения с другими участникам. Такие навыки включают в себя: совместную работу в команде, эффективную коммуникацию, навыки межличностного общения, самопродвижение, управление конфликтами, адаптивность, нетворкинг, способность оказывать влияние, умение вести переговоры, управлять ожиданиями [4]. Это довольно обширные списки, но при совместной деятельности в проекте приходится использовать большинство из них. Кроме того, развитие этих компетенций является залогом и дальнейшего успешного трудоустройства обучающихся, поскольку, выполнение групповых проектов является самым естественным способом попрактиковать совместную командную работу, управление конфликтами, ведение переговоров и эффективное общение (не говоря уже об управлении ожиданиями).

Литература:

1. Pereira, O. P., & Assoreira, M. J. (2012). *Society and Technological Evolution: Challenges and Opportunities. Regional and Sectoral Economic Studies*, 12(2), 51-67.
2. Pereira, O. P., Carlos Alberto A. T. Costa. *The importance of soft skills in the university academic curriculum: The perceptions of the students in the new society of knowledge. International Journal of Business and Social Research*, [S.l.], v. 7, n. 6, p. 01-12, July 2017.
3. Marisa Morby *The underrated skills that will make you a better employee (and human being)*. <https://www.themuse.com/advice/the-underrated-skills-that-will-make-you-a-better-employee-and-human-being> (reference date: 10.12.2018).

УДК 378.14:001.81

PROJECT ACTIVITY AS A BASIS FOR DEVELOPING “HARD & SOFT SKILLS”

Rozhdestvenskaya L.N.

Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia, 20, K. Marx Prospect, building 2, Novosibirsk, 630073.
Russia
e-mail: lada2006job@mail.ru

The value of human capital increases when passing from industrial economy to knowledge-driven economy. The system of personnel training based on developing hard skills is gradually becoming irrelevant. This problem is especially important in biotechnology. Not only does project activity allow developing interdisciplinary competences but also stimulates expanding hard and soft skills.

Key words: biotechnology, project activity, hard and soft skills

As biotechnology contributes to improving the quality of human life, it can become one of the most dynamically developing and profitable businesses of the 21st century. “The Complex Program of Developing Biotechnologies in the Russian Federation up to 2020” implies active development of bioenergetics, biopharmaceutics, and biomedicine as well as industrial, agro- and food biotechnologies.

Project activity becomes the basis for training specialists able to implement biotechnological interdisciplinary projects throughout their entire life cycle. Hard skills -measurable and standardized – were much in demand in the period of industrial economy. However, now the time of knowledge-driven economy has come. Activities where developed skills will not considerably change with time are gradually disappearing and the number of communications will be extremely limited [1, 2, 3]. Biotechnology is one of the fields where transformation processes are impetuous and fast. The revolution of knowledge has already made it possible to automate the majority of technological processes and many of hard skills are quickly becoming irrelevant. Besides, there is an urgent need in biotechnological projects to arrange interaction of a great number of interdisciplinary specialists often from different nations and cultures. And this is impossible without taking into account soft skills. Modern joint activity is communicating with other people. This is an environment for negotiations, compromises and communication. Thus, an acute necessity emerges to develop an education system which could train people according to these needs.

Project activity of students is the most efficient way of developing both internal soft skills which determine an attitude of students to themselves (e.g. self-confidence, self-awareness, self-compassion, accepting criticism, critical thinking, resilience, perseverance, emotion management, patience, perceptiveness and growth mindset) and external soft skills responsible for interrelations with other participants. These skills include collaborative teamwork, effective communication, interpersonal skills, self-promotion, conflict management, adaptability, networking, an ability to exert influence and conduct negotiation and expectation management [4]. These are quite extensive lists but we have to use most of them in collaborative teamwork on the project. In addition, the development of these competences guarantees further successful employment of students because carrying out group projects is the most natural way to practice collaborative teamwork, conflict management, conducting negotiations and effective communication, not to mention expectation management.

References:

1. Pereira, O. P., & Assoreira, M. J. (2012). *Society and Technological Evolution: Challenges and Opportunities. Regional and Sectoral Economic Studies*, 12(2), 51-67.
2. Pereira, O. P., Carlos Alberto A. T. Costa. *The importance of soft skills in the university academic curriculum: The perceptions of the students in the new society of knowledge. International Journal of Business and Social Research*, [S.l.], v. 7, n. 6, p. 01-12, July 2017.

3. Marisa Morby *The underrated skills that will make you a better employee (and human being)*. <https://www.themuse.com/advice/the-underrated-skills-that-will-make-you-a-better-employee-and-human-being> (reference date: 10.12.2018).

УДК 615.1, УДК 378.14

СОВРЕМЕННЫЕ ВЫЗОВЫ В ПОДГОТОВКЕ БИОТЕХНОЛОГОВ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ

Пятигорская Н.В., Беляев В.В., Шабалина М.М.

ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия
119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2
e-mail: belyaev-mma@yandex.ru

В фармацевтическом секторе экономики заняты специалисты, имеющие различное базовое образование и решающие задачи разного уровня сложности. В рамках данного проекта была разработана профессионально-компетентностная модель фармацевтической отрасли, на основе которой были определены профессиональные области, для которых могут готовиться выпускники образовательных программ высшей школы.

Ключевые слова: концепция опережающей подготовки кадров; опережающие компетенции; опережающее содержание; отраслевая рамка квалификаций

Кадровый потенциал фармацевтической отрасли – это фундамент, обеспечивающий ее устойчивое развитие, особенно в условиях необходимости ее развития по траектории, направленной на обеспечение импортозамещения и повышение конкурентоспособности [1]. В настоящее время существенной проблемой при сопряжении кадрового заказа фармацевтической отрасли с системой профессиональной подготовки кадров является отсутствие единых организационных и методических подходов к определению, описанию и дальнейшей актуализации содержания образования. Указанная проблема обостряется множественностью областей профессиональной деятельности в отрасли. Так, в фармацевтическом секторе экономики заняты специалисты, имеющие различное базовое образование (химики, биологи, химики-технологи, биотехнологи, провизоры и пр.) и решающие задачи разного уровня сложности.

Таким образом, обеспечение соответствия выпускника меняющимся требованиям экономики вызывает необходимость постоянной адаптации моделей подготовки под эти требования. Это, в свою очередь, предполагает необходимость трансформации управления образовательными процессами, формирования такой системы подготовки кадров, которая отслеживает изменения в требованиях экономики к выпускнику и способна обеспечить необходимую адаптацию образовательного процесса.

Данные вопросы рассматривались в рамках инициированного Минобрнауки России проекта «Разработка модели системы многоуровневой опережающей подготовки кадров для обеспечения перспективного развития фармацевтической отрасли Российской Федерации». В рамках данного проекта была разработана профессионально-компетентностная модель фармацевтической отрасли, которая определяет зоны и области профессиональной деятельности, основные профессиональные задачи в этих областях. На основе такой модели были определены профессиональные области, для которых могут готовиться выпускники образовательных программ высшей школы. Данный подход был апробирован участниками проекта при разработке ОПОП и ДПП, и, в целом, признан эффективным для обеспечения именно опережающей подготовки кадров. Результаты проекта показали, что в концепции опережающей подготовки должны быть разграничены опережающие компетенции и опережающее содержание.

На Всероссийской конференции [2], проводившейся 12 ноября 2018 г., многие результаты проекта были поддержаны и легли в основу резолюции, включая: создание отраслевой рамки квалификаций; поддержание созданной модели подготовки кадров для фармацевтической отрасли; создание электронного Банка компетенций и платформы образовательных курсов и другие.

Литература:

1. Постановление Правительства Российской Федерации № 91 от 17 февраля 2011 г. «О Федеральной целевой программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу»
2. Всероссийская конференция «Опережающая подготовка кадров для фармацевтической отрасли: вызовы и перспективы»

URL: <http://nacpharmpalata.ru/events/vserossiyskaya-konferenciya-oper> (дата обращения: 14.01.2019)
https://www.youtube.com/watch?v=XA_0Zuicha4 (дата обращения: 14.01.2019).

УДК 615.1, УДК 378.14

CONTEMPORARY CHALLENGES IN THE TRAINING OF BIOTECHNOLOGISTS FOR THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Pyatigorskaya N.V., Belyaev V.V., Shabalina M.M.

*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, building 2
 e-mail: belyaev-mma@yandex.ru*

In the pharmaceutical sector of economy, there are specialists with various basic education that solve problems of different levels of complexity. Under the project, a professional competence model of the pharmaceutical industry was developed; on the basis of this model professional areas were identified, for which graduates of higher education programs can be trained.

Key words: concept of advanced training; advanced forward-looking competences; advanced forward-looking content; industry qualifications framework

The human resources in pharmaceutical industry provide the foundation for its sustainable development, especially in the context of the need for industry development along the trajectory, aimed at ensuring import substitution and increasing competitiveness [1]. Currently, a significant problem when trying to match recruitment needs of the pharmaceutical industry with the system of professional training is the lack of consistent organizational and methodological approaches to the definition, description and further actualization of education. This problem is exacerbated by diversity of areas of professional activity in the industry. Thus, in the pharmaceutical sector of economy, there are specialists with various basic education (chemists, biologists, chemical technologists, biotechnologists, pharmacists, etc.) that solve problems of different levels of complexity.

Thus, ensuring the graduate's compliance with the changing requirements of the economy requires constant adaptation of training models to these requirements. This, in turn, implies the need to transform the management of educational processes, the formation of such a system of personnel training, which tracks changes in the economy's requirements for graduates and is capable of providing the necessary adaptation of the educational process.

These issues were considered in the framework of the project initiated by the Ministry of education and science "Development of a model of a multi-level advanced training system to ensure the prospective development of the pharmaceutical industry of the Russian Federation". Under the project, a professional competence model of the pharmaceutical industry was developed, which defines the zones and areas of professional activity, the main professional tasks in these areas. On the basis of this model professional areas were identified, for which graduates of higher education programs can be trained. This approach was tested by the project participants during the development of the Main professional education program and additional professional program, and, in general, was found to be effective for providing advanced forward-looking training. The results of the project showed that within the concept of advanced training advanced forward-looking competences and advanced forward-looking content should be differentiated.

At the all-Russian conference [2] held on November 12, 2018, many of the project's results were confirmed and formed the basis of the resolution, including: creation of an industry qualifications framework; maintaining the established training model for the pharmaceutical industry; creation of an electronic Bank of competencies and a platform of educational courses and others.

References:

1. Decree of the Government of the Russian Federation No. 91 of February 17, 2011 "On the Federal Target Program "Development of Pharmaceutical and Medical Industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and further perspective"
2. The all-Russian conference "Advanced training for the pharmaceutical industry: challenges and prospects"
 URL: <http://nacpharmpalata.ru/events/vserossiyskaya-konferenciya-oper> (access date: 14.01.2019)
https://www.youtube.com/watch?v=XA_0Zuicha4 (access date: 14.01.2019).

УДК 663.1

СПЕЦИФИКА ПРОЕКТИРОВАНИЯ ПРИМЕРНЫХ ОСНОВНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПРОФИЛЕЙ ПО НАПРАВЛЕНИЮ ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Титова И.М.

*Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия
236022, Калининград, Советский проспект, д. 1
e-mail: inna.titova@klgtu.ru*

Особенности сырьевой базы животного сырья способствуют созданию сегментированного подхода при проектировании образовательного процесса с целью удовлетворения потребностей в подготовке высококвалифицированных специалистов различных профилей для перерабатывающей отрасли и науки

Ключевые слова: образовательные программы, профили, ФГОС

Продукты питания животного происхождения подразумевают широкий ассортимент продукции. Данное сырье, в целом, содержит большое количество усваиваемого протеина и имеет высокую биологическую ценность. На сегодняшний день, существуют самые разнообразные виды животного сырья и технологий его переработки, в том числе альтернативные источники белка. Рынок сырья животного происхождения в России постоянно расширяется. В связи с этим предъявляются высокие требования к подготовке кадров для производственного сектора и перспективных исследований.

Согласно официальному перечню, к продовольственному (пищевому) сырью животного происхождения относятся: молоко, казеин, мясо сельскохозяйственных животных, мясные субпродукты, животные жиры, дичь, птицу, яйцо и яйцопродукты, рыба и морепродукты, продукция пчеловодства. Спектр готовой продукции огромен и постоянно дополняется новыми видами.

Образовательный процесс с целью унификации подготовки специалистов и возможности быстрой переквалификации в зависимости от потребностей региона и рынка труда в целом направлен на изучение общих технологических процессов. А поскольку сырье животного происхождения имеет широкий спектр, соответственно каждый из видов сырья животного происхождения имеет свою специфику и особенности химического, биохимического состава и технологический приемов обработки. В соответствии с этим, существует возможность создания профилей образовательных программ по направлению Продукты питания животного происхождения, в зависимости от вида сырья.

Таким образом, примерные основные образовательные программы профилей, отвечающие современным требованиям действующих профессиональных стандартов и ФГОС 3++ по данному направлению, могут быть следующими: технология мяса и мясных продуктов; технология молока и молочных продуктов; технология рыбы и морепродуктов; и другие.

UDC 663.1

SPECIFICITY OF DESIGNING OF EXEMPLARY MAIN EDUCATIONAL PROGRAMS OF PROFILES FOR DIRECTION ANIMAL FOOD PRODUCTS

Titova I.M.

*Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia
236022, Kaliningrad, Sovetsky Avenue, 1
e-mail: inna.titova@klgtu.ru*

Features of the raw material base of animal raw materials contribute to the creation of a segmented approach to the design of the educational process in order to meet the training needs of highly qualified specialists of various profiles for the processing industry and science

Key words: educational programs, profiles, GEF

Foods of animal origin imply a wide range of products. This raw material, in general, contains a large amount of digestible protein and has a high biological value. Today, there are a wide variety of animal raw materials and technologies for its processing, including alternative sources of protein. The market for raw materials of animal origin in Russia is constantly expanding. In this regard, there are high demands on training for the manufacturing sector and advanced research.

According to the official list, food (food) raw materials of animal origin include milk, casein, meat of farm animals, meat by-products, animal fats, game, poultry, egg and egg products, fish and seafood, beekeeping. The range of finished products is huge and constantly complemented by new types.

The educational process in order to unify the training of specialists and the possibility of rapid retraining depending on the needs of the region and the labor market as a whole is aimed at studying general technological processes. And since raw materials of animal origin have a wide range, respectively, each of the types of raw materials of animal origin has its own specifics and features of chemical, biochemical composition and processing methods. In accordance with this, it is possible to create profiles of educational programs in the direction of Foodstuffs of animal origin, depending on the type of raw materials.

Thus, the approximate basic educational programs of profiles that meet the current requirements of current professional standards and GEF 3 ++ in this area can be the following: technology of meat and meat products; technology of milk and dairy products; fish and seafood technology; other.