МАТЕРИАЛЫ КОНГРЕССА

CONGRESS PROCEEDINGS

ТОМ 1 / PART 1

IX МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

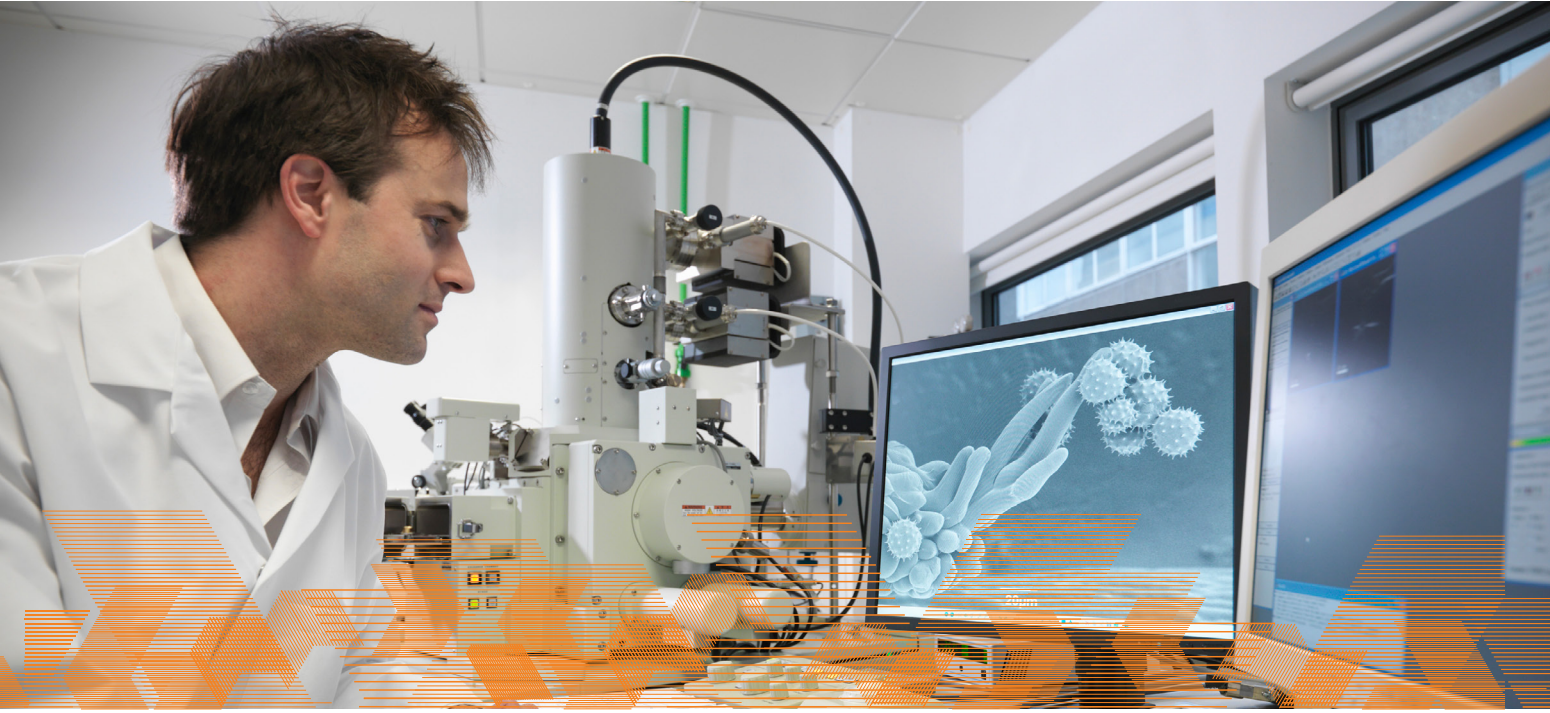
БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

20-22 ФЕВРАЛЯ 2017
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4

IX INTERNATIONAL CONGRESS

BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES

20-22 FEBRUARY, 2017
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW



ДОСТУП К БИОЛОГИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ, НЕОБХОДИМОЙ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

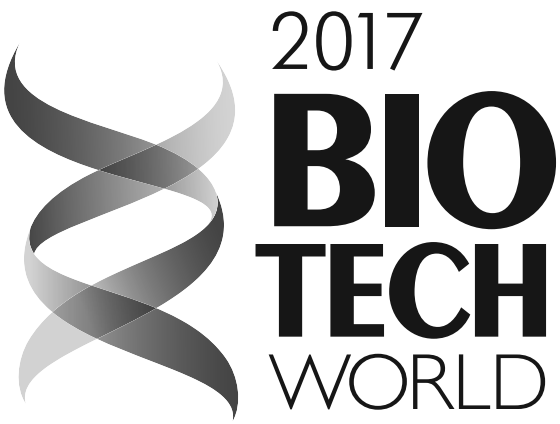
Pathway Studio позволяет понять и визуализировать механизмы биологических процессов и протекания заболеваний, строить сигнальные и метаболические пути на основе крупнейшей в мире регулярно пополняемой библиотеки взаимодействий молекулярно-биологических объектов, находить известные и предсказывать новые биомаркеры и мишени для лекарств, анализировать экспрессию генов, протеомные и метаболомные данные.

Pathway Studio Mammalian поможет вам проанализировать данные ваших крупномасштабных экспериментов, в том числе, с использованием микрочипов и NGS, чтобы ответить на важные вопросы:

· Повышенная регуляция каких белков наблюдается при интересующем меня заболевании?
· Какие еще функционально схожие молекулы могут быть связаны с моим биомаркером-кандидатом?
· Какие белки следует использовать в ходе исследований связывания для данного потенциального препарата?
· Как данная мутация влияет на метаболизм кандидата?

Pathway Studio Plant предназначен для совершенствования фундаментальных исследований и технологий, применяемых в органическом сельском хозяйстве. Система позволяет использовать хорошо изученные модели функционирования растений, интерпретировать экспериментальные данные и формировать новые сигнальные пути для ассоциации признаков, увеличения урожайности и улучшения устойчивости к болезням.

www.elsevier.ru



WWW.BIOMOS.RU

ТОМ 1 / PART 1

IX МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

20-22 ФЕВРАЛЯ 2017
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4

IX INTERNATIONAL CONGRESS

BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES

20-22 FEBRUARY, 2017
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW

УДК 575.1/2::612.017.1
ББК 28.072
Б63

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС «БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»

Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»
20-22 ФЕВРАЛЯ 2017 Г.

ООО “РЭД ГРУПП”, 2017
УДК 575.1/2::612.017.1
ББК 28.072
ISBN 978-5-9909118-0-2

Настоящие материалы конгресса созданы на основании информации, предоставленной участниками конгресса.

© ООО “РЭД ГРУПП”
119049, г. Москва, ул. Мытная,
д. 28, стр. 3, комн. 6

Материалы тезисов публикуются в авторской версии. Организаторы не несут ответственности за неточности и упущения в названиях и адресах, представленных в данном сборнике.

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

The proceedings of International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives»
FEBRUARY 20-22, 2017.

LLC “RED GROUP”, 2017

These proceedings are based on information provided by congress participants. Organizer does not bear any responsibility for omissions and mistakes.

© LLC “RED GROUP”, Moscow

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

Организационный комитет / Organizing Committee .....3 / 5

Редакционная коллегия / Editorial board .....7 / 10

Программный комитет / Program Committee .....12 / 16

Конкурсная комиссия / Contest Committee .....20 / 22

1. Фундаментальные вопросы биотехнологии / Biotechnology: foundations and challenges

Фундаментальные исследования и биотехнология / Fundamental research and biotechnology 24

Биокатализ и биокаталитические технологии / Biocatalysis and biocatalytic technologies 39

2.Биотехнология и медицина / Biotechnology and medicine

Биоматериалы в биотехнологиях и медицине / Biomaterials in biotechnologies and in medicine.... 85

Биотехнология и медицина / Biotechnology and medicine 117

Внеклеточные везикулы и циркулирующие микроРНК / Extracellular vesicles and circulating microRNA 223

Иммунная биотехнология / Immune biotechnology.....250

Функциональные и специальные продукты питания / Functional and special food products 275

Инновации в медицинской биотехнологии / Innovation in medical biotechnology 285

3. Биофармацевтика / Biopharmaceutics

Промышленная и фармацевтическая биотехнология / Industrial and pharmaceutical biotechnology 314

4. Биоинформатика и IT / Bioinformatics and IT

Биоинформатика и IT / Bioinformatics and IT 371

5. Биоэкономика/Bioeconomics

Биогеотехнология / Biogeotechnology 430

Биологическая трансформация загрязнений в окружающей среде: закономерности и практические аспекты / Biological transformations of contaminants in the natural environment: patterns and practical aspects 464

Биотехнология и образование / Biotechnology and education 519

ELSEVIER

СПОНСОР СЕКЦИИ БИОИНФОРМАТИКА И IT
SPONSOR OF BIOINFORMATICS AND IT SECTION

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, член Президиума РАН, научный руководитель Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, сопредседатель Оргкомитета
Романовский Михаил Юрьевич	д.ф.-м.н., начальник Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере науки ФАНО России, сопредседатель Оргкомитета
Чехонин Владимир Павлович	академик РАН, член Президиума РАН, руководитель Отдела и зав. кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, сопредседатель Программного комитета
Варфоломеев Сергей Дмитриевич	член-корр. РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
Егоров Алексей Михайлович	академик РАН, зав. лабораторией инженерной энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Алешников Владимир Евгеньевич	директор Конгресса «Биотехнология:состояние и перспективы развития» и Выставки «Мир биотехнологии-2017», ответственный секретарь Оргкомитета
Иванов Виктор Петрович	Президент Российского союза химиков
Кирпичников Михаил Петрович	академик РАН, декан биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Ковальчук Михаил Валентинович	член-корр. РАН, директор Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
Крюков Сергей Вениаминович	д.т.н., председатель Совета директоров ОАО «Биофарм»
Лисицын Андрей Борисович	академик РАН, ректор Российского государственного аграрного университета - МСХА им. К.А.Тимирязева
Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, Зам.директора Института биоорганической химиим. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Декан факультета Биотехнологии МГУ им.М.В.Ломоносова
Огородова Людмила Михайловна	член-корр. РАН, зам. министра науки и образования РФ

Скрябин Константин Георгиевич	академик РАН, директор Центра «Биоинженерия» РАН
Тихонович Игорь Анатольевич	академик РАН, директор Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии г. Санкт-Петербург
Тутельян Виктор Александрович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи
Хаитов Рахим Мусаевич	академик РАН, научный руководитель ГНЦ РФ «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Харченко Петр Николаевич	академик РАН, научный руководитель Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии
Цыб Сергей Анатольевич	к.э.н., зам.министра Минпромторга РФ

ORGANIZING COMMITTEE

Valery A. Bykov	Academician of RAS, National Institute of Medicinal Plants, Chair of the Organizing Committee
Alexander I. Archakov	Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Director, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, Co-Chair of the Organizing Committee
Mikhail Y. Romanovsky	Grand PhD (Physics and Mathematics), Head, Department of Coordination and Support of Operations in Science, Federal Agency for Research Organizations (FANO of Russia), Co-Chair of the Organizing Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Section Leader and Head of the Medical Nanobiotechnologies sub-Department, Pirogov Russian State Medical University, Co-Chair of the Program Committee
Sergey D. Varfolomeyev	Corresponding Member of RAS, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Vladimir Y. Aleshnikov	General Director, LLC Expo-Biochem-Technologies, Executive Secretary of the Organizing Committee
Alexey M. Yegorov	Academician of RAS, Professor, Head of Engineering Enzymology Laboratory, Chemical Department, Lomonosov Moscow State University
Victor P. Ivanov	President, Russian Union of Chemists
Vyacheslav M. Lukomets	Academician of RAS, Rector of K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University (MSKhA), Chair of the Conference's Program Committee
Rahim M. Khaitov	Academician of RAS, Director, director of Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
Pyotr N. Kharchenko	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agriculture
Mikhail P. Kirpichnikov	Academician of RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
Mikhail V. Kovalchuk	Corresponding Member of RAS, Director, Kurchatov Institute National Research Center
Sergey V. Kryukov	Grand PhD (Technology), Chair of the Board of Directors, OAO Biopharm
Andrey B. Lisitsyn	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director of Gorbatov FGBNU VNIIMP, Russian Academy of Agriculture

Anatoliy I. Miroshnikov	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Deputy Director of Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Dean of Biotechnology, Lomonosov Moscow State University
Lyudmila M. Ogorodova	Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences, Deputy Minister of Education and Science of the Russian Federation
Constantine G. Skryabin	Academician of RAS, Director, Bioengineering Center, RAS
Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agriculture, St. Petersburg
Victor A. Tutelian	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director, Research Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences
Sergey A. Tsyb	PhD (Economics), Deputy Minister of Industry and Trade of the Russian Federation

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Варфоломеев Сергей Дмитриевич	член-корр. РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
Арчаков Александр Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, сопредседатель Оргкомитета
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,зам.директора Института биохимии им. А.Н.Баха
Евтушенко Евгений Геннадьевич	ассистент кафедры химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова
Зиновьева Наталия Анатольевна	академик РАН, член Президиума РАН, директор ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Кирпичников Михаил Петрович	академик РАН, декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Клячко Наталья Львовна	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ
Колчанов Николай Александрович	академик РАН, 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 физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Легонькова Ольга Александровна	д.т.н., зав. лабораторией ФГБУ «Институт хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России
Лисицын Андрей Борисович	академик РАН, член Президиума РАН, директор 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

Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, зам. директора Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, декан факультета Биотехнологии МГУ им. М.В.Ломоносова
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 Николаевч	первый вице-президент консорциума «Биомак», заместитель декана биологического факультета МГУ по инновациям
Панфилов Виктор Иванович	профессор, зав. кафедрой биотехнологии, РХТУ имени Д.И. Менделеева
Поляков Виктор Антонович	академик РАН, директор ГНУ ВНИИПБТ
Поройков Владимир Васильевич	профессор, заведующий отделом биоинформатики Институт биомедицинскокй химии им.В.Н. Ореховича
Седельникова Галина Васильевна	профессор, заместитель директора Центрального научно-исследовательского геологоразведочного института цветных и благородных металлов
Сорокина Анна Юрьевна	к.б.н., заместитель начальника отдела координации деятельности научных центров Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере наук ФАНО России
Тихонович Игорь Анатольевич	академик РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», И.о. декана Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров
Тутельян Виктор Александрович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель ФГУП « ФИЦ питания и биотехнологии»
Хаитов Рахим Мусаевич	академик РАН, ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Хамитов Равиль Авгатович	генеральный директор ООО «МБЦ «Генериум»
Харитонов Владимир Дмитриевич	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИ молочной промышленности
Харченко Петр Николаевич	академик РАН, научный руководитель Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии

Чехонин Владимир Павлович	академик, член Президиума РАН, руководитель Отдела и зав. кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, сопредседатель Программного комитета
Цыганов Дмитрий Игоревич	д.т.н., профессор, зам.начальника управления ФАНО России
Швец Виталий Иванович	академик РАН, Завкафедрой биотехнологии и бионанотехнологии Московского технологического университета (МИРЭА, МГУПИ, МИТХТ), председатель конкурса молодых ученых
Михаил Исаакович Штильман	д.х.н., профессор, руководитель Учебно-научного центра «Биоматериалы» РХТУ им. Д.И. Менделеева
Яненко Александр Степанович	д.б.н., профессор, зам. директора ФГУП ГНЦ ГосНИИгенетика

EDITORIAL BOARD

Sergey D. Varfolomeyev	Corresponding Member of RAS, Research Head of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Alexander I. Archakov	Academician, Member of the Presidium of the RAS, Academic Leader of Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, Co-Chair of the Organizing Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician, Member of the Presidium of RAS, Section Leader and Head of the Medical Nanobiotechnologies sub-Department, Pirogov Russian State Medical University, Co-Chair of the Program Committee
Nina B. Gradova	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Boris B.Dzantiev	Professor, deputy director of A.N. Bach Institute of Biochemistry
Yevgeny G. Evtushenko	teaching assistant Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University
Natalia A. Zinovyeva	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director of Ernst FGBNU VIZh, Dubrovitsy
Rahim M. Khaitov	Academician of RAS, Academic Leader, FGBU GNC Institute of Immunology, Federal Agency for Medicine and Biology
Pyotr N. Kharchenko	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural Biotechnology
Vladimir D. Kharitonov	Academician of RAS, FGBNU National Institute of Dairy Industry
Mikhail P. Kirpichnikov	Academician of RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
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 Enzimology 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
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, Member of the Presidium 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
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, Member of the Presidium of RAS, Deputy Director of Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Chair of the Academic Council of Pushino Research Center of RAS
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
Victor A. Polyakov	Academician of RAS, Director of FGBNU VNIIPBT
Vladimir V. Poroykov	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural and Functional Design of Pharmaceuticals, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
Galina V. Sedelnikova	Professor, Deputy Director, Central Research Institute of Geological Exploration of Non-Ferrous and Noble Metals
Vitaly I. Shvets	Bionanotechnology, Lomonosov State University of Fine Chemical Technologies (MITKh), Chair of Young Researchers' Contest
Michail I. Shtilman	Grand PhD (Chemistry), professor, D.I. Mendeleyev National University of Chemical Technology
Anna Yu. Sorokina	Grand PhD (Biology), Deputy director of Department of Coordination and Operational Support to Scientific Research Organizations, Federal Agency for Scientific Organizations
Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, Director, FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg
Dmitry I. Tsyganov	Grand PhD (Technology), Professor, Deputy Head of Department, Federal Agency for Research Organizations
Victor A. Tutelian	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director, FGBNU Research Institute of Nutrition
Valentin V. Vlasov	Academician of RAS, Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Alexander S. Yanenko	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director of FGUP GosNIIgenetica State Research Center

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

Петров Рэм Викторович	академик РАН, почетный председатель
Варфоломеев Сергей Дмитриевич	член-корр. РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
Быков Валерий Алексеевич	академик РАН, советник Президиума РАН, Главный научный сотрудник ФГБНУ Всероссийский институт лекарственных растений, председатель Организационного комитета
Арчаков Александр Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, сопредседатель Оргкомитета
Алешников Владимир Евгеньевич	директор конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и выставки «Мир биотехнологии-2017», ответственный секретарь Оргкомитета
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,зам.директора Института биохимии им. А.Н.Баха
Дыгай Александр Михайлович	академик РАН, научный руководитель ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Томск
Евтушенко Евгений Геннадьевич	ассистент кафедры химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова
Егоров Алексей Михайлович	академик РАН, профессор, заведующий лабораторией инженерной энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Зиновьева Наталия Анатольевна	академик РАН, член Президиума РАН, директор ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Золина Галина Дмитриевна	директор Департамента научно-технологической политики и образования Минестерства сельского хозяйства РФ
Кирпичников Михаил Петрович	академик РАН, декан биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Клячко Наталья Львовна	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ

Ковальчук Михаил Валентинович	член-корр. РАН, директор Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
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
Крюков Сергей Вениаминович	д.т.н., председатель Совета директоров ОАО «Биофарм»
Курочкин Илья Николаевич	д.х.н., профессор, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Легонькова Ольга Александровна	д.т.н., зав. лабораторией ФГБУ «Институт хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России
Лисицын Андрей Борисович	академик РАН, член Президиума РАН, директор ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
Лукомец Вячеслав Михайлович	академик РАН, ректор Российского государственного аграрного университета - МСХА им.К.А.Тимирязева
Мартынов Александр Игоревич	к.м.н., первый заместитель директора ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Мартынюк Александр Александрович	директор Всероссийского института лесоводства и механизации лесного хозяйства
Медведев Алексей Михайлович	первый заместитель руководителя ФАНО России
Меньшутина Наталия Васильевна	профессор, директор Российско-Швейцарского учебно-научного центра трансфера фармацевтических биотехнологий, РХТУ им. Д.И. Менделеева
Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, зам. директора Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, декан факультета Биотехнологии МГУ им. М.В.Ломоносова
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
Огородова Людмила Михайловна	член-корр. РАН, зам. министра Минобрнауки РФ

Панфилов Виктор Иванович	профессор, зав. кафедрой биотехнологии, РХТУ им. Д.И. Менделеева
Петров Владимир Иванович	академик РАН, ректор Волгоградского государственного медицинского университета
Поляков Виктор Антонович	академик РАН, директор ГНУ ВНИИПБТ
Попов Владимир Олегович	член-корр. РАН, директор Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Поройков Владимир Васильевич	профессор, заведующий отделом биоинформатики Институт биомедицинскокй химии им.В.Н. Ореховича
Романовский Михаил Юрьевич	д.ф.м.н., начальник Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере наук ФАНО России, сопредседатель Оргкомитета
Северин Евгений Сергеевич	член-корр. РАН, генеральный директор ВНЦ молекулярной диагностики
Седельникова Галина Васильевна	профессор, заместитель директора Центрального научно-исследовательского геологоразведочного института цветных и благородных металлов
Середенин Сергей Борисович	академик РАН, научный руководитель ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»
Систер Владимир Григорьевич	член-корр. РАН, зав. каф. «Процессы и аппараты химической технологии» МПУ (МАМИ)
Сорокина Анна Юрьевна	к.б.н., заместитель начальника отдела координации деятельности научных центров Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере наук ФАНО России
Скрябин Константин Георгиевич	академик РАН, директор Центра «Биоинженерия» РАН
Титов Евгений Иванович	академик РАН, заведущий кафедрой Технологии и биотехнологии продуктов питания животного происхождения МГУПП
Тихонович Игорь Анатольевич	академик РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», И.о. декана Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров
Тутельян Виктор Александрович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель ФГУП « ФИЦ питания и биотехнологии»
Усанов Сергей Александрович	член-корр. НАН Беларуси, член Президиума НАН Беларуси, директор Института биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Хаитов Рахим Мусаевич	академик РАН, ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Хамитов Равиль Авгатович	генеральный директор ООО «МБЦ «Генериум»
Харитонов Владимир Дмитриевич	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИ молочной промышленности
Харченко Петр Николаевич	академик РАН, научный руководитель Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии
Чехонин Владимир Павлович	академик, член Президиума РАН, руководитель Отдела и зав. кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, сопредседатель Программного комитета
Цыб Сергей Анатольевич	к.э.н., зам.министра Минпромторга РФ
Цыганов Дмитрий Игоревич	д.т.н., профессор, зам.начальника управления ФАНО России
Швец Виталий Иванович	академик РАН, Завкафедрой биотехнологии и бионанотехнологии Московского технологического университета (МИРЭА, МГУПИ, МИТХТ), председатель конкурса молодых ученых
Шестибратов Константин Александрович	к.б.н., руководитель группы лесной биотехнологии Филиала ИБХ, г. Пущино
Ширяева Ирина Андреевна	начальник Управления экологической политики Департамента природопользования и охраны окружающей среды города Москвы
Шоба Сергей Алексеевич	член-корр. РАН, декан факультета почвоведения, МГУ им. М.В. Ломоносова
Юдин Борис Григорьевич	член-корр. РАН, руководитель проекта ЮНЕСКО «Биоэтический форум»
Яруллин Рафинат Саматович	генеральный директор ОАО «Татнефтехиминвест-Холдинг», Республика Татарстан
Яненко Александр Степанович	д.б.н., профессор, зам. директора ФГУП ГНЦ ГосНИИгенетика

PROGRAM COMMITTEE

Ram V. Petrov	Academician of the Russian Academy of Sciences, Advisor to the Russian Academy of Sciences, Chair of the Program Committee
Sergey D. Varfolomeyev	Corresponding Member of RAS, Research Head of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Valery A. Bykov	Academician, VILAR Institute, Chair of the Organizing Committee
Alexander I. Archakov	Academician, Member of the Presidium of the RAS, Academic Leader of Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, Co-Chair of the Organizing Committee
Vladimir Y. Aleshnikov	General Director, LLC Expo-Biochem-Technologies, Executive Secretary of the Organizing Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician, Member of the Presidium of RAS, Section Leader and Head of the Medical Nanobiotechnologies sub-Department, Pirogov Russian State Medical University, Co-Chair of the Program Committee
Nina B. Gradova	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Alexander M. Dygay	Academician of RAS, Director of FGBU Pharmacology Research Institute, Siberian Section of RAS, Tomsk
Boris B. Dzantiev	Professor, deputy director of A.N. Bach Institute of Biochemistry
Yevgeny G. Evtushenko	teaching assistant Sub-Department of Chemical Enzimology 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, Member of the Presidium of RAS, Director of Ernst FGBNU VIZh, Dubrovitsy
Rahim M. Khaitov	Academician of RAS, Academic Leader, FGBU GNC Institute of Immunology, Federal Agency for Medicine and Biology
Pyotr N. Kharchenko	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural Biotechnology
Vladimir D. Kharitonov	Academician of RAS, FGBNU National Institute of Dairy Industry
Mikhail P. Kirpichnikov	Academician of RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
Mikhail V. Kovalchuk	Corresponding Member of RAS, Director, Kurchatov Institute National Research Center

Nikolay A. Kolchanov	Academician of RAS, Director of FGBUN Institute of Cytology and Genetics, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Igor V. Krasilnikov	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director for Innovations and International Relations, FGUP SPbNIIVS, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg
Natalia L. Klyachko	Grand PhD (Chemistry), Professor, Head of Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University, deputy director of MSU Nanotechnology Education and Research Center
Sergey V. Kryukov	Grand PhD (Technology), Chair of the Board of Directors, OAO Biopharm
Ilya N. Kurochkin	Grand PhD (Chemistry), Professor, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
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, Member of the Presidium of RAS, Director of Gorbatov FGBNU VNIIMP
Vyacheslav M. Lukomets	Academician of RAS, Rector of K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University (MSKhA), Chair of the Conference's Program Committee
Alexander I. Martynov	PhD (Medicine), First Deputy Director of FGBU Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
Alexander A. Martynuk	Director of All-Russian Research Institute of Silviculture and Mechanisation of Forestry
Natalia V. Menshutina	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
Alexey M. Medevedev	first duputy director of Federal Agency for Scientific Organizations
Anatoly I. Miroshnikov	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Deputy Director of Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Chair of the Academic Council of Pushino Research Center of RAS
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
Lyudmila M. Ogorodova	Corresponding Member of RAS, Deputy Minister of Education and Science of the Russian Federation

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
Victor A. Polyakov	Academician of RAS, Director of FGBNU VNIIPBT
Vladimir O. Popov	Corresponding Member of RAS, Director of Bakh Institute of Biochemistry, RAS, Coordinator of Bioindustry and Bioresources BioTech-2030 Technological Platform
Vladimir V. Poroykov	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural and Functional Design of Pharmaceuticals, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
Michail Yu. Romanovskiy	Grand PhD (Physics and Mathematics), Head of Department of Coordination and Operational Support to Scientific Research Organizations, Federal Agency for Scientific Organizations, Co- Chair of the Organizing Committee
Yevgeny S. Severin	Corresponding Member of RAS, General Director of Molecular Diagnostics and Treatment National Research Center
Galina V. Sedelnikova	Professor, Deputy Director, Central Research Institute of Geological Exploration of Non-Ferrous and Noble Metals
Sergey B. Seredenin	Academician of RAS, Director, FGBU Zakusov Research Institute of Pharmacology
Vitaly I. Shvets	Bionanotechnology, Lomonosov State University of Fine Chemical Technologies (MITKh), Chair of Young Researchers' Contest
Constantine A. Shestibratov	PhD (Biology), Forestry Biotechnology Team Lead, Pushino Branch of Institute of Bio-Organic Chemistry, Pushino
Irina A. Shiryayeva	Head, Directorate of Environmental Policy, Department of Nature and Environmental Protection, Moscow City Government
Sergey A. Shoba	Corresponding Member of RAS, Dean of Edaphology Department, Lomonosov Moscow State University
Vladimir G. Sister	Corresponding Member of RAS, Head of sub-Department of Engineering Ecology of Urban Environment, Director of Institute of Alternative Energy Chemical Technology, University of Machine Engineering
Constantine G. Skryabin	Academician of RAS, Director, Bioengineering Center, RAS
Anna Yu. Sorokina	Grand PhD (Biology), Deputy director of Department of Coordination and Operational Support to Scientific Research Organizations, Federal Agency for Scientific Organizations
Yevgeny I. Titov	Academician of RAS, Director, Institute of Applied Biotechnology

Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, Director, FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg
Dmitry I. Tsyganov	Grand PhD (Technology), Professor, Deputy Head of Department, Federal Agency for Research Organizations
Victor A. Tutelian	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director, FGBNU Research Institute of Nutrition
Sergey A. Usanov	Corresponding Member of National Academy of Sciences of Belarus, Member of the Presidium of NAS, Director, Institute of Bio-Organic Chemistry, Minsk, Belarus
Valentin V. Vlasov	Academician of RAS, Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Boris G. Yudin	Corresponding Member of RAS, Project Manager, UNESCO Bioethics Forum
Rafinat S. Yarullin	General Director, OAO Tatneftekhiminvest-Holding, Republic of Tatarstan
Alexander S. Yanenko	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director of FGUP GosNIIgenetica State Research Center

КОНКУРСНАЯ КОМИССИЯ

СОПРЕДСЕДАТЕЛИ КОНКУРСНОЙ КОМИССИИ:

Швец Виталий Иванович	д.х.н., академик, заведующий кафедрой биотехнологии МИТХТ им. М.В.Ломоносова
Овчинникова Татьяна Владимировна	д.х.н., профессор кафедры биотехнологии Первого МГМУ им. И.М.Сеченова, руководитель Учебно-научного центра ИБХ им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

ЧЛЕНЫ КОНКУРСНОЙ КОМИССИИ:

Булаев Александр Генрихович	к.б.н., и.о. зав. лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов, ФИЦ Биотехнологии РАН
Власов Валентин Викторович	академик РАН, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
Гаппаров Минкаил Гаджиевич	д.м.н., член-корр. РАН, зам.директора НИИ питания РАМН
Глазко Валерий Иванович	д.с.-х.н., академик, профессор Российского государственного аграрного университета им. К.А.Тимирязева
Градова Нина Борисовна	д.б.н., профессор кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И.Менделеева
Дзантиев Борис Борисович	д.х.н., профессор, зам. директора Института биохимии им. А.Н.Баха РАН
Егоров Алексей Михайлович	д.б.н., академик, профессор, зав. лабораторией химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова
Клячко Наталья Львовна	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ
Курочкин Илья Николаевич	д.х.н., профессор, зав. лабораторией экобиокатализа химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова
Курек Денис Вячеславович	к.х.н., генеральный директора Future Biotech
Мартынов Александр Игоревич	к.м.н., Первый зам. директора ГНЦ РФ «Институт иммунологии» ФМБА РФ

Меньшутина Наталья Васильевна	профессор, директор Российско-Швейцарского учебно-научного центра трансфера фармацевтических биотехнологий, РХТУ им. Д.И. Менделеева
Орешкин Евгений Николаевич	первый вице-президент консорциума «Биомак»
Римарева Любовь Вячеславовна	член-корреспондент РАН, д.т.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ ВНИИПБТ
Панфилов Виктор Иванович	д.т.н., профессор, проректор и зав. кафедрой биотехнологии РХТУ им. Д.И.Менделеева
Поройков Владимир Васильевич	профессор, заведующий отделом биоинформатики Научно-исследовательского Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН

СОВЕТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ РАН

Титов Евгений Иванович	академик, МГУ прикладной биотехнологии
Харитонов Владимир Дмитриевич	д.т.н., академик, профессор, ГНУ ВНИИ молочной промышленности РАСХН
Харченко Петр Николаевич	д.б.н., академик, директор ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН
Цыганов Дмитрий Игоревич	д.т.н., профессор, зам.начальника управления ФАНО РФ
Яненко Александр Степанович	д.б.н., профессор, зам. директора ГНЦ РФ ФГУ«ГосНИИгенетика»

CONTEST COMMITTEE

CO-CHAIR OF CONTEST COMMITTEE	
V.I. Shvets	Bionanotechnology, Lomonosov State University of Fine Chemical Technologies (MITKh), Chair of Young Researchers' Contest
T.V. Ovchinnikova	Professor, Biotechnology sub-Department, Sechenov First Moscow State Medical University, Head of Research and Education Center, Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Co-Chair of Young Researchers' Contest
MEMBERS OF CONTEST'S COMMITTEE:	
A.G. Bulaev	PhD (Biology), acting Head of Chemolithotrophic Microorganism Laboratory, Federal Research Center for Biotechnology of RAS
V.V. Vlasov	Academician of RAS, Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
G.M. Gapparov	Grand PhD (Medicine), Corresponding Member of RAS, deputy director of FGBNU Research Institute of Nutrition
V.I Glazko	PhD (Agriculture), academician, professor K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University (MSKhA)
N.B. Gradova	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Boris B.Dzantiev	Professor, deputy director of A.N. Bach Institute of Biochemistry
A.M. Yegorov	Academician of RAS, Professor, Head of Engineering Enzymology Laboratory, Chemical Department, Lomonosov Moscow State University
P.N. Kharchenko	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural
V. D. Kharitonov	Academician of RAS, FGBNU National Institute of Dairy Industry
N.L. Klyachko	Grand PhD (Chemistry), Professor, Head of Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University, deputy director of MSU Nanotechnology Education and Research Center
I.N. Kurochkin	Grand PhD (Chemistry), Professor, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
D.V. Kurek	PhD (Chemistry), General Director Future Biotech

A.I. Martynov	PhD (Medicine), First Deputy Director of FGBU Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
N.V. Menshutina	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
E.N. Oreshkin	PhD (Chemistry), First Vice President, Biomak Consortium
V.I. Panfilov	Professor, Head of sub-Department of Biotechnology of Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
V.V. Poroykov	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural and Functional Design of Pharmaceuticals, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
L.V. Rimareva	Correspondent Member of RAS, Grand PhD (Technical Science), professor, deputy director of FGBNU VNIIPBT

COUNCIL OF YOUNG SCIENTISTS OF RAS

Y.I. Titov	Academician of RAS, Director, Institute of Applied Biotechnology Biotechnology
D.I. Tsyganov	Grand PhD (Technology), Professor, Deputy Head of Department, Federal Agency for Research Organizations
A.S. Yanenko	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director of FGUP GosNIIgenetica State Research Center

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОТЕХНОЛОГИИ
BIOTECHNOLOGY: FOUNDATIONS AND CHALLENGES

ПЛЕНАРНОЕ ЗАСЕДАНИЕ

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

PLENARY SESSION

FUNDAMENTAL RESEARCH AND BIOTECHNOLOGY

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 573.22

БИОИНФОРМАТИКА И СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ

Колчанов Н.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 10
e-mail: kol@bionet.nsc.ru

Подавляющее большинство фенотипических признаков человека, животных, растений и микроорганизмов (молекулярных, биохимических, клеточных, физиологических, морфологических, поведенческих и т.д.) контролируются генными сетями очень сложным образом, то есть группами координированно функционирующих генов, взаимодействующих друг с другом как через свои первичные продукты (РНК и белки), так и через разнообразные метаболиты.

Ключевые слова: генные сети, компьютерное моделирование, обратные связи, ключевые регуляторы, методы реконструкции, эволюция.

В каждой генной сети можно выделить несколько обязательных типов структурных и функциональных компонентов и функциональные модули. Генные сети могут функционировать как на уровне отдельных клеток, так и на уровне ткани, органа, либо целого многоклеточного организма. В этом случае в реализации обратных связей генной сети будут участвовать гены и белки, экспрессирующиеся в различных типах клеток. Выделяют следующие подходы к реконструкции генных сетей: ручная реконструкция генных сетей экспертами с использованием специальных программных средств; извлечение знаний о молекулярно-генетических взаимодействиях и семантических ассоциациях различного типа из текстов научных публикаций (методы text-mining); методы автоматической интеграции гетерогенных данных о молекулярно-генетических взаимодействиях, метаболических и сигнальных путях, генных сетях и др. из различных источников данных, основанные на использовании онтологических подходов. Реконструкция и компьютерный анализ различных генных сетей показывают, что в случае жесткой необходимости приспосабливаться к суровым условиям среды, большинство адаптивных вариантов аллелей зафиксировались не в

генах метаболизма, а в небольшом количестве регуляторных звеньев (иерархически высоких точек), которые обеспечили настройку на оптимальный уровень функционирования генной сети. Математическое моделирование динамики генных сетей позволило сначала теоретически, а затем экспериментально оптимизировать продукцию молочной кислоты клетками *Geobacillus* spp.

UDC 573.22

BIOINFORMATICS AND SYSTEMS BIOLOGY

Kolchanov N.A.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave. 10
e-mail: kol@bionet.nsc.ru

Various phenotypical traits (molecular, biochemical, cellular, physiological, morphological, behavioral etc.) in human, animals, plants and microorganisms are controlled by gene networks in a complicated way as groups of co-functioning genes interacting with each other via either their primary products (RNA and proteins) or metabolites.

Key words: gene network, computer simulation, feedback loop, key regulator, methods of reconstruction, evolution.

There are several essential structural and functional components or functional modules in every gene network. Gene networks may function at various levels of biological organization: individual cell, tissue, organ or entire multicellular organism. In the latter case, feedback loops in a gene network are realized through the genes and proteins expressing in cells of different types.

The following basic approaches to gene networks reconstruction should be mentioned among many others: manual reconstruction of gene networks performed by experts using special software; automated knowledge extraction for molecular-genetic interactions and semantic associations of various types from scientific publications (text-mining); automated integration of heterogeneous data on molecular-genetic interactions, metabolic and signaling pathways etc. from various data sources basing on ontological approaches.

Reconstruction and computer analysis of various gene networks show that in the case of dire necessity of adaptation to harsh environmental conditions, the majority of adaptive allelic variants is fixed rather in small number of regulatory elements (hierarchically high elements) than in genes of metabolism. These elements provide “adjustment” to the “optimal” gene network functioning.

Numerical simulations of gene networks dynamics allowed us to theoretically predict optimization of lactic acid production by *Geobacillus* spp cells and later to experimentally prove this optimization.

ПРОЕКТИРОВАНИЕ БИОЧИСТИЛЬЩИКОВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ

П. Массон

Казанский федеральный университет, лаборатория нейрофармакологии,
Российская Федерация, Казань 420000, ул. Кремлёвская, 18
pym.masson@free.fr

Методы лечения отравлений фосфорорганическими (ФО) пестицидами и нервно-паралитическими отравляющими веществами (НПОВ) являются несовершенными. Использование биочистильщиков представляет собой перспективный подход к повышению эффективности как предэкспозиционной (доконтактной) профилактики отравлений ФО соединениями (ФОС), так и лечения, проводимого после воздействия ФОС на пациента [(1)]. Биочистильщики действуют путём нейтрализации ФОС в кровотоке до того, как последние достигнут своих физиологических целей. Реакция нейтрализации ФОС должна протекать быстро для ослабления вредного воздействия молекул токсина: необратимое угнетение ацетилхолинэстеразы в нервной системе и воздействие на не-холинэргические цели. Биочистильщики могут представлять собой природные или рекомбинантные ферменты, реагирующие на ФОС, целевые белки или антитела. Они вводятся в организм

методом инъекции или ингаляции и должны выводиться из кровотока медленно. Кроме того, биочистильщики должны обладать свойством иммуносовместимости и не вызывать ятрогенных побочных эффектов. В идеальном варианте может использоваться комплекс из нескольких биочистильщиков для профилактики отравления всеми типами ФОС. Биочистильщики, которые можно будет применять во внелабораторных условиях, должны иметь низкую себестоимость и достаточно длинные сроки хранения с сохранением стабильности.

Биочистильщики первого поколения являлись стехиометрическими. Они представляли собой сериновые ферменты (холинэстеразы, карбоксилэстеразы) которые подвергались необратимому фосфорилированию под воздействием НПОВ. Было установлено, что из числа таких ферментов человеческая бутирилхолинэстераза (BChE) является безопасной и эффективной в обезвреживании многих LD50 НПОВ (2). Однако стехиометрическая нейтрализация смертельных доз ФОС требует введения огромных доз дорогостоящих биофармацевтических препаратов. Поэтому применение стехиометрических биочистильщиков даже для защиты сотрудников служб экстренного реагирования является нереалистичной задачей с учётом имеющихся технологий производства. Были предприняты усилия, направленные на разработку новых способов массового производства человеческой BChE как из плазмы, так и рекомбинантной (1).

Биочистильщики второго поколения проявляют каталитическую активность в отношении ФО-гидролазы. В отличие от стехиометрических биочистильщиков, биоловушки второго поколения способны нейтрализовать ФОС в условиях первого порядка с функциональным циклом (3). Благодаря высокому значению константы скорости бимолекулярного процесса (k_{cat}/K_m>10^6 $M^{-1}min^{-1}$), для быстрой нейтрализации токсичности НПОВ необходимы лишь небольшие дозы фермента. Наиболее перспективными каталитическими биочистильщиками являются полученные методом направленной эволюции фосфотриэстеразы (стабильные мутеины ферментов, полученных из бактерий, архей и параоксоназы-1 млекопитающих). Эти искусственно выведенные ферменты демонстрируют энантиомерную избирательность к наиболее токсичным стереоизомерам НПОВ, обеспечивая защиту in vivo от НПОВ, включая НПОВ типа V (4). Ведётся активная работа по созданию и других ферментов. Такие другие ферменты представляют собой ФО-гидролазы, например пролидазы, мутеины холинестэраз – каталитические антитела, а также оксидазы (3). Исследования новых каталитических биочистильщиков основаны на компьютерном перепроектировании известных ферментов, реагирующих на ФОС, включая холинэстеразы; на комбинационных стратегиях мутагенеза/эволюции, и на скрининге больших библиотек мутировавших/эволюционировавших ферментов. Кроме того, успешно применена стратегия компьютерной обработки структурированных баз данных и молекулярного моделирования для обнаружения ферментов, способность которых к гидролизу ФОС не предполагалась (5). И наконец, скрининг экстремальных биотопов привёл к открытию высокостабильных термофильных фосфотриэстераз, которые могут представлять интерес (6).

Соединение мутантных форм холинестэразы – не подверженных «старению» после фосфориляции – с быстрореактивирующимися инновационными оксимами ведёт к созданию псевдокаталитических биочистильщиков (3). И наконец, хорошие перспективы имеют также исследования искусственных ферментов, т.е. функционализированных бета-циклодекстринов и гибридных молекул, несущих нуклеофильные группы. Некоторые малые молекулы доказали свою эффективность в нейтрализации НПОВ с высокой скоростью как *in vitro*, так и *in vivo* (1). Химическое модифицирование и/или инкапсуляция в наночастицы повышают стабильность стехиометрических и каталитических биочистильщиков в кровотоке и предотвращают иммунную реакцию не-человеческих ферментов.

Ожидается, что в ближайшем будущем каталитические и псевдокаталитические биочистильщики позволят резко повысить эффективность и безопасность медицинских мер лечения отравления ФОС и снизить их стоимость. Наномедицинские технологии позволят облегчить получение биочистильщиков с длительным эффектом для нейтрализации широкого спектра отравляющих веществ. И наконец, многообещающим является переходное *in vivo* –поколение каталитических биочистильщиков, использующих короткоиндукционные векторы. Тем не менее, впереди ещё долгий путь разработки безопасной и эффективной генной терапии.

Литература:

1. Masson, P and Nachon, F. (2017) J. Neurochem., in press.
2. Lockridge, O. (2015) Pharmacol. Ther., 148, 34-36.
3. Masson, P. and Luschekina, SV. (2016) Chem-Biol. Interact., 259 (part B), 319-326.
4. Wille T, Neumaier K, Koller M, Ehinger C, Aggarwal N, Ashani Y, Goldsmith M, Sussman JL, Tawfik DS, Thiermann H and Worek F (2016) Toxicol. Lett. 25,198-206.
5. Jacobs, RB, Michaels, KC, Anderson CJ, Fay, JM. and Dokholyan, NV. (2016) Sci. Reports, 6, e37175.
6. Jacquet P, Daudé D, Bzdrenga J, Masson P, Elias M and Chabrière E. (2016) Environ Sci Pollut Res Int. 23, 8200-8218.

ENGINEERING OF BIOSCAVENGERS AGAINST ORGANOPHOSPHORUS AGENTS

P. Masson

Kazan Federal University, Neuropharmacology laboratory, Kremlevskaya Str., 18, Kaz an, 420000 Russian Federation
pym.masson@free.fr

Therapy of organophosphorous (OP) pesticides and nerve agent (NA) poisoning is imperfect. Bioscavengers constitute a promising approach for improving pre- and post-exposure treatments of OP poisoning [(1)]. Bioscavengers act by neutralizing OPs in the bloodstream before they reach physiological targets. Neutralisation reaction has to be fast to impair the deleterious action of toxic molecules: irreversible inhibition of acetylcholinesterase in nervous system, and action on non-cholinergic targets. Bioscavengers can be natural or recombinant OP-reacting enzymes, target proteins, or antibodies. They are administered by injection or inhalation. Their clearance from blood must be slow. In addition, they must be immuno-compatible and do not cause iatrogenic side effects. Ideally, association of several bioscavengers could be used for prophylaxis against all types of OPs. Fieldable bioscavengers have to be produced at low cost and must be stable on storage.

First generation bioscavengers are stoichiometric bioscavengers. These are serine enzymes (cholinesterases, carboxylesterases) that are irreversibly phosphylated by NAs. Among them, human butyrylcholinesterase (BChE) has proven to be safe and effective in challenging multiple LD_{50} of NAs [(2)]. However, stoichiometric neutralization of lethal doses of OPs needs administration of huge doses of costly biopharmaceuticals. Thus, the use of stoichiometric bioscavengers, even for protection of first responders, is unrealistic under current production biopharmaceutical technology. Efforts have been undertaken for developing new methods for mass production of plasma-derived and recombinant human BChE [(1)].

Second generation bioscavengers displays OP hydrolase catalytic activity. Unlike stoichiometric bioscavengers, they are capable of detoxifying OPs under first-order conditions with a turnover [(3)]. By virtue of high bimolecular rate constant (k_{cat}/K_m>10^6 $M^{-1}min^{-1}$), low enzyme doses are needed for rapid detoxification of NAs. The most promising catalytic bioscavengers are evolved phosphotriesterases (stable muteins of enzymes from bacteria, archaea, and mammalian paraoxonase-1). These evolved enzymes display enantiomeric preference for the most toxic NA stereoisomers, and confer in vivo protection against NAs, including V agents [(4)]. However, engineering of other enzymes is actively pursued. These other enzymes are OP hydrolases such as prolidases, mutants of cholinesterases catalytic antibodies, and oxidases [(3)]. Research of novel catalytic bioscavengers is based on computer re-design of known OP-reacting enzymes, including cholinesterases, implementation of combinational strategies for mutagenesis/evolution, and high throughput screening of libraries of mutated/evolved enzymes. Also, a new computational strategy based on mining structural databases and molecular modeling has been successfully applied to find unexpected OP-hydrolyzing enzymes [(5)]. Lastly, screening of extreme biotopes has led to discovery of highly stable thermophilic phosphotriesterases of potential interest [(6)].

Association of cholinesterase mutants - not susceptible to "age" after phosphylation - with fast-reactivating novel oximes leads to pseudo-catalytic bioscavengers [(3)]. Lastly, research on artificial enzymes, i.e. functionalized β-cyclodextrins and hybrid molecules bearing nucleophile groups, is also promising. Certain small molecules have proven their effectiveness in detoxifying NAs at high rate both *in vitro* and *in vivo* [(1)]. Chemical modifications and/or encapsulation into nanoparticles make stoichiometric and catalytic bioscavengers more stable in the bloodstream and prevent immune response of non-human enzymes.

In near future catalytic, pseudo-catalytic bioscavengers are expected to greatly improve medical countermeasures against OP poisoning in terms of efficacy, safety and cost. Nano-medicine technologies will make implementation of bioscavengers easier for long-lasting action against large spectrum of agents. Lastly, transient *in vivo* generation of catalytic bioscavengers, using short-induction vectors, is promising. However, the way for safe and effective gene therapy is still long.

References:

1. *Masson, P and Nachon, F. (2017) J. Neurochem., in press.*
2. *Lockridge, O. (2015) Pharmacol. Ther., 148, 34-36.*
3. *Masson, P. and Luschekina, SV. (2016) Chem-Biol. Interact., 259 (part B), 319-326.*
4. *Wille T, Neumaier K, Koller M, Ehinger C, Aggarwal N, Ashani Y, Goldsmith M, Sussman JL, Tawfik DS, Thiermann H and Worek F (2016) Toxicol. Lett. 25,198-206.*
5. *Jacobs, RB, Michaels, KC, Anderson CJ, Fay, JM. and Dokholyan, NV. (2016) Sci. Reports, 6, e37175.*
6. *Jacquet P, Daudé D, Bzdrenga J, Masson P, Elias M and Chabrière E. (2016) Environ Sci Pollut Res Int. 23, 8200-8218.*

НАНОПЛАЗМОНИКА В БИОТЕХНОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ

Курочкин И.Н.[1], Лагарьков А.Н.[2]

[1]ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук»,
[2]ФГБУН «Институт теоретической и прикладной электродинамики Российской академии наук»

В докладе рассмотрены достижения плазмонной спектроскопии на основе метаматериалов, содержащих диэлектрические и плазмонные резонаторы для целей сверхчувствительной детекции.

Показаны возможности использования этих достижений для создания:

- средств, ориентированных на комплексное определение биологических маркеров различных состояний человека, маркеров ранних стадий заболеваний, нарушения метаболических процессов и на профилактику заболеваний, в том числе, нарушений углеводного обмена, рака, определения концентраций важных веществ и метаболитов в режиме реального времени,
- средств, ориентированных на комплексное определение загрязняющих веществ, токсинов и микробиологических объектов в окружающей среде, пищевых продуктах и сырье.

NANOPLASMONICS IN BIOTECHNOLOGY AND MOLECULAR MEDICINE

Kurochkin I.N.[1], LagarkovA.N.[2]

[1]Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences
[2]Institute for Theoretical and Applied Electromagnetics

Prospects for application of the plasmon spectroscopy based on metamaterials, which contain dielectric and plasmonic resonators for the purposes of highly sensitive detection present in this report.

The report also considered possibility of applying of achievements nanoplasmonics for the development of bioanalytical systems for biomarker, ecotoxicants and microbiological objects detection.

НОВЫЕ ВЫЗОВЫ ДЛЯ БИОМОНИТОРИНГА – ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ – ТОКСИКОЛОГИЯ И АНАЛИЗ РИСКОВ В 21 ВЕКЕ

Аристидис М. Тсатсакис

Иностранный член РАН (гигиена, токсикология)
Профессор, д.б.н., E.R.T., почетный доктор
Директор Департамента Токсикологии & судебнойэкспертизы, Медицинская школа, Университет Крита, Кампус Воутес, Ираклион.

Связь между вредным химическим воздействием ксенобиотиков на здоровье человека и его болезни является предметом многих экспериментальных и эпидемиологических исследований. Этот вопрос остается предметом постоянных дискуссий и споров. Одна из основных проблем в изучении связиязи воздействия химикатов с проблемами со здоровьем это проблема выбора биомаркеров. Эта проблема осложняется тем что в токсичность ксенобиотиков часто вовлечены множественные механизмы, кроме того есть неопределенность связанная с длительным воздействием ксенобиотиков в низких концентрациях, а так же надежным разделением групп подвергшихся воздействию и контрольных групп. Будут кратко обозрены такие характеристики воздействия, как продолжительность и вовлечение различных факторов окружающей среды, смеси данных биомониторинга при длительном воздействия низких концентраций ксенобиотиков с аналитическими проблемами, связанными с вопросами в эпидемиологических исследованиях.

Сценарии воздействия, имитирующие реальную жизнь является сложной задачей, поскольку эффект от воздействия множества химических веществ следует рассматривать как взаимодействие сети. Такое взаимодействие приводит к множеству различных эффектов и последствий для здоровья. В этом отношении линейные - мономодальные, но и нелинейные эффекты можно увидеть в диапазоне низких и/или с высоких концентраций. Оценка эффектов воздействия считается многофакторной задачей, которая требует комплексного и системного подхода не только для длительных воздействий, но часто при острых

или суб хронических экспериментах. Поскольку такая оценка тяжела и отнимает много времени необходим сложный подход для выявления основного действия и эффектов. Специалистам по оценке риска трудно использовать данные полученные при определенных экспериментальных условиях, отличных от универсальных, а иногда и трудно воспроизводимых. В следствие этого важные результаты исследований могут быть проигнорированы до тех пор, пока не появятся дополнительные данные подтверждающие эти результаты. В реальной жизни есть изменчивые и разнообразные общие эффекты которые являются конкретным случаем. Химические вещества в целом имеют большое влияние на здоровье человека и экосистем. Решающее значение имеет выделение возрастания концентраций, это необходимо для эффективной и комплексной оценки рисков и оценки воздействия на популяцию человека и биологических экосистем. Это не тривиальная задача и требует не только биомониторинга и оценки воздействий, но и оценку рисков и нормирование процедур противодействия. Гормонизация в методологиях исследований путем внедрения методики ОЭСР «путь неблагоприятных исходов» и систематическая борьба с искажающими факторами необходимы для лучшей характеризации воздействий и понимания последствий. Таким образом, сложный вопрос о связи между воздействием химических веществ, проблемами со здоровьем и заболеваниями связан с множественными факторами. Эти факторы являются следствием расширения числа категорий химикатов присутствующих одновременно или поочередно, различных механизмов, режимов воздействий, пути неблагоприятных исходов и эффектов, а кроме того от большого количества вмешивающихся факторов и не менее важны факторы возможной восприимчивости из-за генетики и эпигенетики. Несколько эпидемиологических исследований, как в работах *in vivo* так и в работах i*n vitro* показали, что большинство производимых человеком потребительских товаров даже таких как диетические или здорового питания были токсичны для эндокринной системы, нейро тканей, иммунной системы и обладали канцерогенными свойствами по отношению к животным и к человеку.

С учетом самых последних аспектов оценки рисков для индивидов, где оценка воздействия персонализированна, мы можем понять основы и причины непонятной и туманной картины с которой мы сталкиваемся в нашей токсикологической оценке и своевременным разногласием в фактах с правительственными и другими международными и авторскими контролирующими организациями по всему миру. Факт состоит в том, что расширяя сферу нашего знания в целом, мы одновременно расширяем границы нашего знания о невежестве. Будучи очень солидарным с Сократом я полагаю, что предложение выше делает шаг вперед и уточняет для общества глубокий смысл утверждений Сократа: «Я ничего не знаю, кроме факта своего невежества».

NEW CHALLENGES FOR BIOMONITORING - EXPOSURE ASSESSMENT -TOXICOLOGY AND RISK ANALYSIS IN 21 CENTURY

A. M. Tsatsakis

Academician RAS (Hygiene-Toxicology)
Professor and Chairman, Ph.D., E.R.T., D.Sc., D.HonorisC.,
Department of Toxicology & Forensic Science, Medical School, University of Crete, Voutes Campus, Heraklion 71003

Linking xenobiotic chemical exposure to health effects and diseases has been the subject of many experimental and epidemiological studies, though this issue remains a matter of permanent discussion and controversy. One major issue in linking chemical exposure to health problems refers to choice of biomarkers. This issue is complicated by the multiple mechanisms of xenobiotic toxicity often involved, the uncertainties related to long term and low dose xenobiotic exposure, and the reliable identification of exposed and control groups. The characteristics of exposure as duration and involvement of variable environmental factors, the mixtures and biomonitoring data for xenobiotic's low-level long-term exposure together with analytical problems related to these issues in epidemiological studies will be briefly overviewed.

Exposure scenarios simulating real life is a complex issue as effects from multiply chemicals must be considered as a web of interactions that produce variety of mechanisms of effects and subsequently of health outcomes. In this respect linear –monomodal but also nonlinear effects can be seen in the range of low and/or high concentrations of exposures. Evaluating exposure effects is considered a multifactorial task that needs an integrated and systematic approach not only for long term actions but often for acute or sub chronic actions. Since such evaluations are highly work load and time consuming a sophisticated approach to identify the dominant actions and effects are in need. Risk assessors will have difficulties using data generated under specific experimental conditions which are not universal and sometimes difficult to reproduce. As a consequence, important research findings may be ignored

until such time when further confirmatory evidence becomes available. Real life is a variability and diversity of exposures the overall effect of which are pending on the certain case. Chemicals in general have a major impact on human and ecosystem health and highlighting the increasing need for effective and integrated means of risk assessment and exposure evaluation in human populations and biological ecosystems is crucial. This is not a trivial task and requires not only biomonitoring and exposure assessment but also combination of risk assessment with regulatory measures and actions. Harmonization in study methodologies by implementing OECD's adverse outcome pathway (AOP) approach and systematic dealing with confounders is required for a better characterization of exposure and understanding of the effects. Thus, the complex issue of links between chemical exposures and health problems and diseases is associated with multiple factors that are due to the expanding numbers of the chemical categories being present simultaneously or sequentially, the variety of mechanisms, mode of actions, adverse outcome pathways and effects involved but also on a large number of con-founders and also not less important to be encountered susceptibility due to genetics and epigenetics. Several epidemiological studies but also in vivo and in vitro experimental works showed that big majority of man produced consumer products even for dietary or life style purposes were found to act as endocrine disruptors, neuro developmental toxicants, immune toxicants and carcinogens in animals and humans.

Taking into consideration most recent aspects for risk assessment of individuals, where exposure assessment is personalized, we can realize the grounds and causation of the incomprehensible and hazy picture we face in our toxicology evaluations and the timely disagreement in facts among governmental and other international and authorial regulatory organizations throughout the world. It is a fact that as we expand the sphere of our knowledge in general we simultaneously expand the borders of our knowledge with ignorance. Being highly respectable to Socrates I suggest that the above sentence takes a step forward and clarifies for the public the deep meaning of the Socrates statement" I know nothing except the fact of my ignorance".

УДК 571.27

НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА СОЗДАНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Хаитов М.Р.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия
115478, г. Москва, Каширское шоссе, дом 24
e-mail: mr.khaitov@nrcii.ru

Создан иммунобиологический комплекс на основе молекул миРНК против гена ИЛ-4 для терапии бронхиальной астмы. Показано, что препарат на основе фуллерена С60 может быть востребован для терапии легкой и умеренной форм атопического дерматита.

Ключевые слова: аллергические заболевания, иммунотропные препараты, аллерген-специфическая иммунотерапия, фуллерен С60, миРНК, РНК-интерференция.

Одной из самых значимых иммунопатологий на сегодняшний день является аллергопатология, включающая в себя триаду заболеваний: бронхиальная астма (БА), атопический дерматит (АД) и аллергический ринит (АР). По данным ЕААКИ распространенность аллергии в Европе достигает 30%, при этом в ближайшие 15 лет прогнозируется рост до 50%. С учетом этого разработка лекарственных средств (ЛС) на основе новых технологий является перспективным направление в биомедицине.

Традиционная аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) вызывает толерантность к аллергену и обеспечивает торможение прогрессии заболевания даже после прекращения лечения. Аллерготропины являются новым типом препаратов для АСИТ, не имеющим аналогов среди терапевтических форм аллергенов. Аллерготропины «БЕРПОЛ», «ТИМПОЛ» и «ПОЛПОЛ» проходят в настоящее время клинические испытания.

В наших исследованиях была показана эффективность АСИТ при таком АЗ, как атопический дерматит [1]. Причем, показано, что сукцинилированный аллерген может быть перспективным терапевтическим средством для АСИТ при АД.

Прогресс в лечении АД может быть достигнут путем использования наноуглеродных технологий, и в частности, использования фуллерена С60, как новой платформы для создания противовоспалительных

препаратов. Фуллерен С60, как мощный антиоксидант, способен эффективно инактивировать синглетный кислород и свободные радикалы, образующиеся в процессе воспаления.

Водный раствор фуллерена С60 мы получаем по уникальной разработанной нами технологии без использования токсичных органических растворителей, температуры и нагревания [2]. В предварительных опытах на мышах, с использованием модели АД нами было установлено, что фуллерена С60 значительно снижает кожное воспаление и в определенной степени восстанавливает функцию кожного барьера [3]. Таким образом, потенциально мы показали, что препарат на основе фуллерена может быть востребован для терапии легкой и умеренной форм АД.

Открытие в 1998 году феномена интерференции РНК – механизма подавления активности генов посредством молекул малых интерферирующих РНК (миРНК) открыло разработчикам новые возможности в создании ЛС [4]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что наибольшее значение в формировании БА принадлежит ИЛ-4 [5]. Поэтому были спроектированы молекулы миРНК против данного гена (siIL4), а также был создан катионный пептид, выступающий в роли носителя (LTP). Для данного комплексного препарата siIL-4/LTP были проведены доклинические исследования, показавшие его способность подавлять активности данного гена в легких мышей на 30%, что в итоге приводило к снижению гиперрактивности бронхов на 20%, снижению инфильтрации провоспалительных клеток – эозинофилов в ткань легких на 38%. Токсикологический исследования данного препарата позволили отнести его к классу малотоксичных препаратов с LD50 = 325 мг/кг. Помимо этого, препарат не обладает иммунотоксичностью, не аллергенен и не канцерогенен.

Таким образом, препараты на основе фуллерена С60 и миРНК способны подавлять аллергическое воспаление и могут быть перспективны для терапии аллергических заболеваний.

Литература:

1. *Shershakova N., Bashkatova E., Babakhin A., Andreev S., Nikonova A., Shilovsky I., Kamyshnikov O., Buzuk A., Elisyutina O., Fedenko E., Khaitov M. (2015) Allergen-Specific Immunotherapy with Monomeric Allergoid in a Mouse Model of Atopic Dermatitis // PLoS ONE 10(8): e0135070. doi:10.1371/journal.pone.0135070*
2. *Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev A., Osipova N., Shershakova N., Khaitov M. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method. Simple way to fullerene aqueous solution // Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2015. V.23(9):792-800. DOI: 10.1080 / 1536383X.2014.998758*
3. *Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshnikov O., Nikonova A., Khaitov M. (2016) Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis // Journal of Nanobiotechnology 14(1):1483-1493, DOI: 10.1186/s12951-016-0159-z*
4. *Шиловский И.П. et al. Интерференция РНК - новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016. Т. 79, № 4. С. 35–44.*
5. *Khaitov M.R. et al. Small interfering RNAs targeted to interleukin-4 and respiratory syncytial virus reduce airway inflammation in a mouse model of virus-induced asthma exacerbation // Hum. Gene Ther. 2014. Vol. 25, № 7. P. 642–650.*

.....

UDC 579.66

NOVEL TECHNOLOGICAL PLATFORM FOR IMMUNOTHERAPEUTIC DRUG DEVELOPMENT

Khaitov M.R.

National Research Center - Institute of Immunology FMBA of Russia,
115478, Moscow, Russian Federation, Kashyrskoe shosse 24.
e-mail: mr.khaitov@nrcii.ru

Immunotherapeutic complex consisting of siRNA targeted to IL-4, which reduces the main bronchial asthma features in animal models was developed. It was shown that the drug based on the fullerene C60 can be used for the treatment of mild to moderate forms of atopic dermatitis.

Ключевые слова: allergic diseases, immunotherapeutic drugs, specific immunotherapy, fullerene C60, siRNA, RNA interference.

Allergy which includes bronchial asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis, currently is one of the main forms of immunopathology. The prevalence of allergy Europe reaches 30%, but European Academy of Allergy and

Clinical Immunology predicts increase of allergy incidence up to 50% in the nearest 15 years.

Traditional allergen-specific immunotherapy (ASIT) using the re-administration of the allergen in increasing doses causing tolerance to an allergen is known and used for more than 100 years now. Allergotropins are a new class of drugs for ASIT. Currently, allergotropins developed in NRC Institute of Immunology FMBA Russia «BERPOL», «TIMPOL» and «POLPOL» are undergoing clinical trials.

We have also demonstrated that ASIT is an effective approach in the treatment of AD [1]. It was shown that ASIT with a succinylated allergen represents promising approach for the treatment of AD.

Allergic and inflammatory skin diseases like AD are mediated by oxidative stress. Fullerene and some of its derivatives as potent antioxidants are capable of effective reactive oxygen species inactivation.

We have proposed a new simple biocompatible method for preparation of C60 aqueous solution [2]. Fullerene C60 application inhibits the inflammatory process, restores to some extent the function of the skin barrier and may represent a perspective therapeutic approach to control allergic inflammation [3].

The discovery in 1998 of RNA interference phenomenon – the mechanisms of negative gene regulation using short interfering RNA molecules allowed to develop a novel gene-specific drugs [4]. Experimental data showed that IL-4 plays a key role in BA pathogenesis [5]. So, the complex of siRNA targeted to IL-4 (siIL4) and lysine transfer peptide (LTP) used as a vehicle (siIL-4/LTP) was designed for preclinical studies. Mice treated with siIL4/LTP complex demonstrated a 30% reduction of IL-4 expression in lungs. The airway hyperreactivity in mice treated with siIL4/LTP was significantly decreased by 20%. Histological analysis of lung tissue of mice treated with siIL-4/LTP demonstrated the decrease of eosinophil infiltration (by 38%) indicating that the siIL4/LTP complex inhibit allergic inflammation in lungs. Toxicological studies allow consider siIL4/LTP complex, which showed LD50=0325 mg/kg, as low-toxic compound. Additional studies demonstrated immunotoxicological, cancerogenic and allergenic safety of this complex.

Thus, administration of siIL-4/LTP complex inhibits allergic airway inflammation and airway hyperreactivity in a mouse model of BA that is a promising approach for reduction of BA symptoms. In addition, the use of nC60 in form of EC application is a promising alternative therapeutic approach to control allergy inflammation.

References:

1. *Shershakova N., Bashkatova E., Babakhin A., Andreev S., Nikonova A., Shilovsky I., Kamyshnikov O., Buzuk A., Elisyutina O., Fedenko E., Khaitov M. (2015) Allergen-Specific Immunotherapy with Monomeric Allergoid in a Mouse Model of Atopic Dermatitis // PLoS ONE 10(8): e0135070. doi:10.1371/journal.pone.0135070*
2. *Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev A., Osipova N., Shershakova N., Khaitov M. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method. Simple way to fullerene aqueous solution // Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2015. V.23(9):792-800. DOI: 10.1080 / 1536383X.2014.998758*
3. *Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshnikov O., Nikonova A., Khaitov M. (2016) Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis // Journal of Nanobiotechnology 14(1):1483-1493, DOI: 10.1186/s12951-016-0159-z*
4. *Shilovskiy I.P. et al. RNA Interference: New Approach to the Treatment of Allergic Asthma // Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology. 2016. Vol. 79, No 4. P. 35–44.*
5. *Khaitov M.R. et al. Small interfering RNAs targeted to interleukin-4 and respiratory syncytial virus reduce airway inflammation in a mouse model of virus-induced asthma exacerbation // Hum. Gene Ther. 2014. Vol. 25, № 7. P. 642–650.*

УДК 379.8.092.2

ПОСТГЕНОМНАЯ МЕДИЦИНА: МОЛФИ – МОЛЕКУЛЯРНОЕ СЕЛФИ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА

Лисица А.В., Лохов П.Г

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121, Москва, ул.Погодинская, д.10 стр.8
e-mail: lisitsa063@gmail.com

Обсуждается возможность мониторирования состояния организма с использованием технологии прямого масс-спектрометрического анализа сухой капли крови.

Ключевые слова: метаболом, омикс-диагностика, биоинформатика, постгеномные технологии.

Молфи (по аналогии с “selfie”) – быстрый (моментальный) способ получения человеком своего молекулярного образа. Технически реализуется как панорамная биометрия организма на молекулярном уровне, а именно, метаболомный анализ крови (т.е. анализ всех метаболитов крови).

Организм человека – это открытая система, сохраняющая постоянство своего внутреннего состава посредством скоординированных биохимических реакций. Субстратами, промежуточными и конечными продуктами этих реакций являются метаболиты. Измерение совокупности концентраций этих метаболитов является исчерпывающей характеристикой организма, позволяющей оценить состояние здоровья на молекулярном уровне и дать молекулярную (а поэтому объективную и достоверную) картину всех существующих отклонений от нормы вне зависимости от природы их возникновения (будь то патологические процессы, нарушение в питании, лекарственные или иные интоксикации, генетические аномалии и т.д.).

Молекулярное селфи можно получить путем масс-спектрометрического анализа 1 мкл капиллярной крови в течение 1 минуты, зарегистрировав при этом концентрации 5 тысяч метаболитов. Таким образом, молекулярное селфи является быстрым, общедоступным и чрезвычайно эффективным средством для массового (само)контроля здоровья пациентов.

Литература:
1. *Лохов П.Г., Лисица А.В., Арчаков А.И. Метаболомный анализ крови: назначение, реализация, интерпретация данных // Биомедицинская химия. - 2016. - (в печати)*
2. *Лохов П.Г. Метаболом плазмы крови для диагностики и оценки риска возникновения рака простаты, рака легкого и сахарного диабета 2-го типа: Автореф. докт. биол. наук. — Москва, 2015.—42 с.*
3. *Лисица А.В., Пономаренко Е.А., Лохов П.Г., Арчаков А.И. Постгеномная медицина: альтернатива биомаркерам // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2016. - №3. - С. 255-260.*
4. *Lokhov P.G., Balashova E.E., Voskresenskaya A.A., Trifonova O.P., Maslov D.L., Archakov A.I. Mass spectrometric signatures of the blood plasma metabolome for disease diagnostics // Biomed. Rep. 2016. Vol.:4(1), стр:122-126*

UDC 379.8.092.2

POSTGENOMIC MEDICINE: MOLFIE – MOLECULAR SELFIE BASED ON METABOLOMICS ANALYSIS

Lisitsa A.V., Lokhov P.G.

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
Zip code 119121, 10 Pogodinskaya st., Moscow, Russia
e-mail: lisitsa063@gmail.com

Molfie (on the analogy of «selfie») is a smart method of producing a person’s molecular image. It is technically realized as panoramic biometrics of the body at the molecular level, that is metabolomic blood test (i.e., all the blood metabolite analysis).

Human body is an open system that preserves the consistency of its internal structure by means of coordinated biochemical reactions. Substrates, intermediates and final products of these reactions are metabolites. Measurement of aggregate concentrations of these metabolites is a comprehensive description of the body, which allows to assess the state of health at a molecular level and give molecular (objective and accurate) picture of all existing deviations from the norm regardless of the nature of their origin (whether pathological processes, violation in food, drugs or other intoxications, genetic abnormalities, etc.).

Molecular selfie can be obtained by mass spectrometric analysis of 1 uL capillary blood in 1 minute, thus detecting at the same concentration of five thousands of metabolites. Consequently, molecular selfie is a fast, accessible and highly effective tool for mass health check.

References:
1. *P.G. Lokhov, A.V. Lisitsa, A.I. Archakov Metabolomic blood test: purpose, administration, data interpretation // Biomeditsinskaya Khimiya Journal (Journal of Biomedical Chemistry), 2016 (in print)*
2. *P.G. Lokhov Blood plasma metabolome in diagnostics and risk assessment for prostate cancer, lung cancer, and type 2 diabetes. Author’s summary of the habilitation dissertation in biology, Moscow, 2015, 42 pages.*
3. *A.V. Lisitsa, Y.A. Ponomarenko, P.G. Lokhov, A.I. Archakov Post-genomic medicine: an alternative to biolabeling // Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences, 2016, Issue No. 3, pages 255-260.*
4. *Lokhov P.G., Balashova E.E., Voskresenskaya A.A., Trifonova O.P., Maslov D.L., Archakov A.I. Mass spectrometric signatures of the blood plasma metabolome for disease diagnostics // Biomed. Rep. 2016. Vol.:4(1), стр:122-126*

УДК 615.322, 577.29

ФЕРМЕНТЫ РЕПАРАЦИИ ДНК КАК ВАЖНЕЙЩИЕ МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ АНТИРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Лаврик О. И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, Новосибирск,проспект ак. Лаврентьева д. 8
e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Неисправности в работе систем репарации ДНК связаны с тяжелыми наследственными заболеваниями человека, а также с возникновением рака и старением. Дефекты систем репарации являются причиной возникновения онко- и нейродегенеративных заболеваний человека. В то же время, в онкотерапии используются подходы, основанные на направленном повреждении ДНК раковых клеток. При этом ингибирование репарации ДНК в процессе лечения повышает эффективность как химио-, так и радиотерапии. В связи с этим, ключевые ферменты систем репарации являются важнейшими мишенями для создания химиотерапевтических препаратов. К таким мишеням относится регулятор систем репарации ДНК – поли-(АДФ-рибоза)-полимераза1(PARP1), АР-эндонуклеаза1(APE1), ДНК-полимераза бета (Pol beta) и целый ряд других ферментов и белковых факторов, вовлеченных в репарацию модифицированных оснований ДНК, разрывов цепей ДНК и в удаление объемных повреждений, создаваемых химиотерапевтическими агентами. К числу перспективных мишеней относится фермент тирозил-ДНК-фосфодиэстераза1 (Tdp1). Этот фермент является важной мишенью в случае противоопухолевой терапии, основанной на применении ингибиторов топоизомеразы1 (Top1) [1,2]. Tdp1 играет ключевую роль в удалении аддуктов Top1-ДНК, стабилизированных ингибиторами Top1, такими как камптотецин и его клинические производные. Мутация или делеция гена Tdp1 делает клетки гиперчувствительными к камптотецину, и, наоборот, гиперэкспрессия Tdp1 приводит к защите клеток от повреждений ДНК, вызванных камптотецином. Следовательно, подавление активности Tdp1 может значительно усилить терапевтический эффект ингибиторов Top1 [3,4]. Нами был синтезирован и исследован в качестве ингибиторов Tdp1 обширный спектр соединений, относящихся к различным химическим классам, с использованием оригинального биосенсора для определения активности этого фермента в режиме реального времени [5-9]. Селекция наиболее перспективных соединений проводилась также с помощью компьютерного моделирования. Селективность действия ингибиторов подтверждена в ходе анализа ингибирования активности обширного спектра других белков репарации ДНК, таких как PARP1, PARP2, APE1, Pol beta. Найденные нами ингибиторы Tdp1 превосходят мировые аналоги по эффективности в десятки раз. Соединения обладают умеренной или слабой цитотоксичностью, что облегчает их использование в совокупности с клиническими препаратами на основе камптотецина. Некоторые из обнаруженных ингибиторов Tdp1 усиливали цитотоксический эффект камптотецина в отношении опухолевых клеток, сенсибилизируя клетки к его воздействию [8,9]. Были найдены соединения-лидеры для исследований in vivo. Эксперименты на мышах с привитой карциномой Льюис показали высокую эффективность ингибиторов Tdp1 к сенсибилизации опухоли к действию клинического производного камптотецина – топотекана. В комбинации с топотеканом ингибитор Tdp1 уменьшал вес первичной опухоли минимум на 30%, число метастазов на 70% по сравнению с монотерапией топотеканом. Таким образом, нами разработано несколько новых классов высоко эффективных ингибиторов Tdp1, обладающих значительным потенциалом как препараты для противоопухолевой терапии, основанной на применении ингибиторов Top1. Впервые продемонстрирована возможность использования этих соединений для усиления противоопухолевого эффекта антираковых препаратов in vivo.

Работа поддержана грантом РНФ 16-13-10074.

Литература:

1. *Cortes Ledesma F., El Khamisy S. F., Zuma M. C., Osborn K., Caldecott K. W. A human 5′-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage // Nature. 2009. Vol. 461. P. 674–678.*
2. *Comeaux E. Q. and van Waardenburg R. C. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // Drug Metab. Rev. 2014. Vol. 46. P. 494–507.*
3. *Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // Chem. Biol. 2010. Vol. 17. P. 421–433.*
4. *Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond // Nat. Rev. Cancer. 2006. Vol. 6. P. 789–802.*
5. *Zakharenko A., Khomenko T., Zhukova S., Koval O., Zakharova O., Anarbaev R., Lebedeva N., Korchagina D., Komarova N., Vasiliev V., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety // Bioorg. Med. Chem. 2015.*

Vol. 23. P. 2044–2052.
6. *Zakharenko A. L., Ponomarev K. U., Suslov E. V., Korchagina D. V., Volcho K. P., Vasil'eva I. A., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. Inhibitory properties of nitrogen-containing adamantane derivatives with monoterpenoid fragments against tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. P. 657–662.*
7. *Arabshahi H. J., van Rensburg M., Pilkington L. I., Jeon C.Y., Song M., Gridel L.-M., et al. A synthesis, in silico, in vitro and in vivo study of thieno[2,3-b]pyridine anticancer analogues // Med. Chem. Comm. 2015. Vol. 6. P. 1987–1997.*
8. *Khomenko T., Zakharenko A., Odarchenko T., Arabshahi H. J., Sannikova V., Zakharova O., Korchagina D., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. New inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp 1) combining 7-hydroxycoumarin and monoterpenoid moieties // Bioorg. Med. Chem. 2016. Vol. 24. P. 5573–5581.*
9. *Zakharenko A., Luzina O., Koval O., Nilov D., Gushchina I., Dyrkheeva N., Švedas V., Salakhutdinov N., Lavrik O. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors: Usnic Acid Enamines Enhance the Cytotoxic Effect of Camptothecin // J. Nat. Prod. 2016. Vol. 79. P. 2961–2967.*

УДК 615.322, 577.29

DNA REPAIR PROTEINS AS THE MAJOR TARGETS FOR ANTI-CANCER DRUGS DEVELOPMENT

Lavrik O.I.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS
630090, Novosibirsk, Russia, prospect Lavrentiev, 8
e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Defects in the DNA repair systems are associated with a serious hereditary human diseases, as well as with mechanisms of aging. Defects in repair systems can cause oncological and neurodegenerative diseases. At the same time, antitumor therapy bases on direct DNA damage of cancer cells. Thus inhibition of DNA repair increases the efficiency of chemo- and radiotherapy. In this regard, key repair enzymes are important targets for creating chemotherapeutic drugs. Search of inhibitors of DNA repair enzymes such as poly-(ADP-ribose)-polymerase 1 (PARP1), AP endonuclease 1 (APE1), DNA polymerase beta (Pol beta) is currently one of the main goal of medicinal chemistry. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) is also the promising target enzyme. This enzyme is an important target in anti-tumor therapy based on the use of topoisomerase 1 (Top1) inhibitors [1,2]. Tdp1 plays an important role in the removal of Top1-DNA adducts stabilized by Top1 inhibitors, such as camptothecin and its derivatives. Mutation or deletion in Tdp1 gene makes cells hypersensitive to camptothecin, and vice versa, Tdp1 overexpression leads to cells protection against DNA damage caused by camptothecin. Consequently, Tdp1 activity suppression can enhance therapeutic effect of Top1 inhibitors [3,4]. We have synthesized and investigated as Tdp1 inhibitors a broad spectrum of compounds belonging to the different chemical classes, using an original biosensor to determine the enzyme activity in real time [5-9]. Selection of the most promising compounds was also carried out by computer simulation. Selectivity of inhibitor action was confirmed by the inhibition analysis of the activity of other DNA repair proteins such as PARP1, PARP2, APE1, Pol beta. Tdp1 inhibitors we found surpass world analogues tenfold in efficiency. The compounds have a moderate or low cytotoxicity, which facilitates their use in conjunction with clinical drugs based on camptothecin. Some of the identified Tdp1 inhibitors enhance cytotoxicity of camptothecin against tumor cells, sensitizing the cells to its effects [8,9]. We have chosen leading compounds for studies in vivo. We used mice with Lewis carcinoma to investigate the ability of Tdp1 inhibitors to sensitize tumor to the effect of topotecan (clinical camptothecin derivative). In combination with topotecan Tdp1 inhibitor reduced the primary tumor weight at least 30%, the number of metastases by 70% compared to topotecan monotherapy. Thus, we have developed several new classes of highly potent Tdp1 inhibitors that have significant potential as drugs for anti-tumor therapy based on the use of Top1 inhibitors. We demonstrated for first time the use of these compounds for potentiating the antitumor effect of anticancer drugs in vivo.

This work was supported by grant RNF 16-13-10074.

References:

1. *Cortes Ledesma F., El Khamisy S. F., Zuma M. C., Osborn K., Caldecott K. W. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage // Nature. 2009. Vol. 461. P. 674–678.*
2. *Comeaux E. Q. and van Waardenburg R. C. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // Drug Metab. Rev. 2014. Vol. 46. P. 494–507.*
3. *Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // Chem. Biol. 2010. Vol. 17. P. 421–433.*
4. *Laev S.S., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase inhibitors: Progress and potential. //*

Bioorg. Med. Chem. 2016 Vol. 24. P. 5017–5027.
5. *Zakharenko A., Khomenko T., Zhukova S., Koval O., Zakharova O., Anarbaev R., Lebedeva N., Korchagina D., Komarova N., Vasiliev V., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety // Bioorg. Med. Chem. 2015. Vol. 23. P. 2044–2052.*
6. *Zakharenko A. L., Ponomarev K. U., Suslov E. V., Korchagina D. V., Volcho K. P., Vasil'eva I. A., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. Inhibitory properties of nitrogen-containing adamantane derivatives with monoterpenoid fragments against tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. P. 657–662.*
7. *Arabshahi H. J., van Rensburg M., Pilkington L. I., Jeon C.Y., Song M., Gridel L.-M., et al. A synthesis, in silico, in vitro and in vivo study of thieno[2,3-b]pyridine anticancer analogues // Med. Chem. Comm. 2015. Vol. 6. P. 1987–1997.*
8. *Khomenko T., Zakharenko A., Odarchenko T., Arabshahi H. J., Sannikova V., Zakharova O., Korchagina D., Reynisson J., Volcho K., Salakhutdinov N., Lavrik O. New inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp 1) combining 7-hydroxycoumarin and monoterpenoid moieties // Bioorg. Med. Chem. 2016. Vol. 24. P. 5573–5581.*
9. *Zakharenko A., Luzina O., Koval O., Nilov D., Gushchina I., Dyrkheeva N., Švedas V., Salakhutdinov N., Lavrik O. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors: Usnic Acid Enamines Enhance the Cytotoxic Effect of Camptothecin // J. Nat. Prod. 2016. Vol. 79. P. 2961–2967.*

ПРИМЕНЕНИЕ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СОВРЕМЕННЫХ БЕЗОПАСНЫХ ВАКЦИН

О.В. Карпова, М.П. Кирпичников, И.Г. Атабеков

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр12,
e-mail: okar@genebee.msu.ru

Разработан универсальный подход для создания вакцин нового поколения на основе структурно модифицированных вирусов растений. Показана возможность использования вирионов и вирусоподобных частиц вирусов растений в качестве эффективных и безопасных адъювантов.

Ключевые слова: вирусы растений, современные вакцины, структурно модифицированные и вирусоподобные частицы.

Вирусы растений безопасны для млекопитающих (человека) и могут накапливаться в больших количествах (до 10г на 1кг) в листьях зараженных растений. Выделение большинства фитовирусов не требует больших временных и материальных затрат. В связи с этим вирионы и вирусоподобные частицы (ВПЧ), полученные из белка оболочки вирусов растений, в последнее время рассматривают как основу для создания новых биотехнологий, в том числе при разработке современных вакцин.

При создании вакцин одной из основных проблем является проблема адъювантов, входящих в состав вакцинных препаратов. Применяемые в настоящее время адъюванты, как правило, либо токсичны, либо недостаточно эффективны. Вирусы растений и ВПЧ являются высоко иммуногенными и могут одновременно служить платформами для образования комплексов с антигенными детерминантами патогенов и адъювантами.

Нами разработан универсальный подход для создания вакцин нового поколения против инфекций человека и сельскохозяйственных животных, на основе структурно модифицированных вирусов растений. Модификация осуществляется при кратковременном нагревании (94-98ºС) препарата палочковидного вируса со спиральной структурой - вируса табачной мозаики. В результате образуются стабильные сферические частицы (СЧ) регулируемого размера белковой природы, обладающие уникальной способностью адсорбировать на своей поверхности белки различного состава и размера, в том числе антигенные детерминанты патогенов человека и животных. При этом СЧ являются эффективным адъювантом, активирующим как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. То есть, СЧ одновременно могут играть роль платформы для презентации антигенов инфекционных агентов и адъюванта. Таким образом, использование СЧ, декорированных рекомбинантными антигенами, позволяют смоделировать безопасную вирусную частицу, способную заменить аттенуированные вирионы патогенов, которые используются в препаратах большинства вакцин. На основе СЧ созданы образцы кандидатных вакцин против краснухи, гриппа, ротавирусной инфекции, энцефаломиокардита крупного рогатого скота и др.

В серии экспериментов продемонстрирована возможность использования вирионов и ВПЧ нитевидных вирусов со спиральной структурой (Х вирус картофеля, вирус мозаики альтернантеры) в качестве эффективных и безопасных адъювантов.

PLANT VIRUSES FOR DEVELOPMENT OF MODERN SAFE VACCINE

O.V. Karpova, M.P. Kirpichnikov, J.G. Atabekov

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Russia, 119234, 1-12 Leninskie Gory
e-mail: okar@genebee.msu.ru

An universal approach for design of new generation vaccines based on structurally modified plant viruses was developed. The possibility of using virus-like particles and virions of plant viruses as effective and safe adjuvants was demonstrated.

Key words: plant viruses, modern vaccine, structurally modified particles, virus-like particles.

Plant viruses are safe for mammals (humans), and can accumulate in large quantities in the leaves of infected plants (up to 10 g per 1 kg). Isolation and purification of most plant viruses is simple and low-cost. Therefore plant virus virions and virus-like particles (VLPs), derived from viral coat protein, have recently been considered as a basis for new biotechnology development, including modern vaccines.

Need for effective and safe adjuvant is one the main problem in the vaccines development. Adjuvant is a key component of vaccine. Currently used adjuvants generally toxic or insufficiently effective. Plant viruses and their VLPs are highly immunogenic and can simultaneously serve as adjuvants. and a platform for assembly complexes with antigenic determinants.

We developed an universal approach for design new generation vaccines for human infections and vetirenary, based on structurally modified plant viruses. The modification is carried out by a short-term heating (94-98ºS) of virus with helical structure - tobacco mosaic virus. This treatment leads to formation of stable protein spherical particles (SPs) with determined size, which have the unique ability to adsorb proteins of various composition and size, including antigenic determinants of human and animal pathogens.

Herewith, SPs is an effective adjuvant activating both humoral and cellular immune response. SPs can simultaneously play the role of adjuvant and a platform for pathogen antigens presentation. Thus, SPs decorated with recombinant antigens allows to simulate safe viral particle capable to replace attenuated pathogenic virions that are used in majority of vaccines. Candidate vaccines against rubella, influenza, rotavirus, encephalomyocarditis, etc were developed on the base of SPs.

The possibility of using filamentous plant virus virions and VLPs with a helical structure (potato virus X, alternantera mosaic virus) as an effective and safe adjuvants was demonstrated in other experiments.

.....

УДК 575.112

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПОДХОДЫ К РЕПОЗИЦИОНИРОВАНИЮ ЛЕКАРСТВ

Поройков В. В., Дружиловский Д. С., Муртазалиева Х. А., Иванов С. М., Погодин П. В., Рудик А. В., Лагунин А. А., Филимонов Д. А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), Москва, Россия119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8
e-mail: vladimir.poroikov@ibmc.msk.ru

Рассмотрены возможности репозиционирования лекарственных препаратов на основе компьютерной оценки структурно-функциональных взаимоотношений «лекарственный препарат – фармакологическая мишень – биологический процесс – болезнь». Показано, что применение методов биоинформатики позволяет извлекать дополнительные знания из обширных разнородных биомедицинских и клинических данных и устанавливать новые возможные применения введенных в клиническую практику лекарств.

Ключевые слова: лекарственный препарат; показания к применению; химико-биологические взаимодействия; биоинформатика; репозиционирование лекарств.

Репозиционирование лекарств, то есть выявление новых областей применения для разрешенных к медицинскому применению препаратов, позволяет искать средства для терапии ранее неизлечимых заболеваний, заменять дорогостоящие препараты более дешевыми, повышать безопасность и эффективность существующей терапии. Поскольку временные и финансовые издержки на репозиционирование лекарств

существенно ниже, чем для создания препарата de novo, такие разработки могут осуществляться академическими исследователями. Экспериментальное исследование действия лекарственных препаратов на множество фармакологических мишеней представляет собой весьма трудоемкую задачу, поэтому поиск новых показаний для старых лекарств осуществляют с применением компьютерных методов биоинформатики. При этом используют всю совокупность имеющейся биомедицинской и клинической информации, включая: обнаружение неожиданных побочных эффектов; установление взаимодействий лекарства с новыми мишенями; построение новых регуляторных сетей, уточняющих специфические признаки заболевания; выявление препаратов, которые бы воздействовали на определенные фенотипические проявления заболевания; определение новых ассоциативных взаимосвязей методами текстомики. Многие известные примеры репозиционирования лекарств обусловлены случайными находками, однако в последнее время с этой целью предпринимается систематический компьютерный скрининг. В докладе будут рассмотрены доступные в Интернете веб-ресурсы, позволяющие осуществлять прогнозирование профилей биологической активности, и проведен сравнительный анализ их предсказательной способности на примере анализа выборки из 50 репозиционированных лекарств. Мы также представим результаты анализа скрытого фармакологического потенциала лекарственных препаратов, разрешенных к применению в России, в контексте утвержденного в июне 2016 года Минпромторгом и Минздравом РФ перечня биомишеней для разработки схожих по фармакотерапевтическому действию и улучшенных аналогов инновационных лекарственных препаратов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ-DST № 16-45-02012-INT/RUS/RSF/12.

UDC 575.112

COMPUTER-AIDED APPROACHES TO DRUG REPOSITIONING

Poroikov V. V., Druzhilovskiy D. A., Murtazalieva K. A., Ivanov S. M., Pogodin P. V., Rudik A. V., Lagunin A. A., Filimonov D. A.

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia
119121, Moscow, Pogodinskaya Street, 10, bldg. 8
e-mail: vladimir.poroikov@ibmc.msk.ru

We consider the possibilities of drug repositioning based on computer evaluation of structure-function relationships «drug - pharmacological target - biological process - disease.» It is shown that the application of bioinformatics methods provides the extraction of additional knowledge from the large heterogeneous biomedical and clinical data and discovery of new possible indications for the launched medicines.

Key words: drug; indications; chemical-biological interactions; bioinformatics; drug repurposing.

Drug repurposing, which means the identification of new applications for the launched pharmaceuticals, creates possibilities of finding new therapies for unmet medical needs, the discovery of more efficacious treatments, replacing expensive with cheap drugs, substituting safer drugs for drugs with unwanted effects. Due to the smaller resources necessary for drug repurposing in comparison with de novo drug development, academic researchers may perform drug-repurposing projects. Experimental investigation of the effects of drugs on the multiple pharmacological targets is a very laborious task; so the search for new indications for old drugs is carried out using computational bioinformatics methods. In this case, the total universe of available biomedical and clinical information is used, including: the detection of unexpected side effects; the establishment of drug interactions with new targets; construction of new regulatory networks, specifying particular signs of the disease; identification of pharmaceutical agents that would affect certain phenotypic manifestations of the disease; identification of new associative linkages by application of text-mining. Many well-known examples of drug repositioning originated from accidental findings; however, in recent years regular computational screening is used for this purpose. We will consider the web-resources available via the Internet, which predict biological activity profiles based on the structural formula of drug-like compounds; and present the results of a comparative analysis of their predictivity on the case study of 50 repositioned drugs. We will also show the results of the analysis of the hidden potential of human drugs launched in Russia, in the context of the approved in June 2016 by the Ministry of Industry and the Ministry of Health of the Russian Federation, the list of biological targets for the development of similar pharmaceuticals and improved analogues of innovative medicines.

The work is supported by the RSF-DST grant No. 16-45-02012-INT/RUS/RSF/12.

СЕКЦИЯ

БИОКАТАЛИЗ И БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

SECTION

BIOCATALYSIS AND BIOCATALYTIC TECHNOLOGIES

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 577.15.1

НОВЫЕ ПАРАДИГМЫ В СОЗДАНИИ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Тишков В.И.[1,2,3], Пометун А.А.[2,3], Зарубина С.А.[1,2], Федорчук В.В.[1,3], Федорчук Е.А.[1,3], Степашкина А.В.[2,3], Атрошенко Д.Л.[1,3], Паршин П.Д.[1], Виролайнен Т.С.[1], Ковалевский Р.П.[1], Чубарь Т.А.[1,3],Бойко К.[2], Эльдаров М.[2], Савин С.С.[1,3]

[1]Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
119991, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3
[2]Институт биохимии им. А.Н.Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия;
119071, Москва, ул. Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
[3]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва, Россия;
109559, Москва, ул. Цимлянская, д. 16, оф. 96.
e-mail: vitishkov@gmail.com

Ферменты и целые клетки все более широко используются в различных биокаталитических процессах. Развитие методов генетической и белковой инженерии позволило изменить стратегию создания биокатализаторов. В докладе рассмотрены новые подходы приведены конкретные примеры.

Ключевые слова: биокатализаторы, генетическая инженерия, рациональный дизайн, биоинформатика

Классический путь получения биокатализаторов предполагает скрининг различных источников ферментов, что является экстенсивным и затратным путем. Секвенирование геномов и развитие биоинформционных подходов позволило значительно ускорить поиск целевых ферментов. Вторым недостатком экстенсивного пути поиска биокатализаторов является несовпадение в большом количестве случаев условий оптимальной работы фермента с оптимальными условиями проведения процесса. Методы генетической и белковой инженерии позволяют направленно менять свойства ферментов.

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования взаимосвязи структура-функция и белковый дизайн физиологически важных ферментов, которые также находят применение на практике. В докладе будут приведены примеры по клонированию, экспрессии и инженерии свойств формиатдегидрогеназ из бактерий S.aureus, дрожжей O.parapolymorpha и S.cerevisiae, различных растений и мха, оксидаз Д-аминокислот из дрожжей T.variabilis и C.boidinii, пенициллинацилазы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-00043) и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 17-04-01469-а, 17-04-01487а, 17-04-01662а).

UDC 577.322.7

NEW PARADIGM IN BIOCATALYSTS CREATION

Tishkov V.I.[1,2,3], Pometun A.A.[2,3], Zarubina S.A.[1,2], Fedorchuk V.V. [1,3], Fedorchuk E.A.[1,3], Stepashkina A.V. [2,3], Atroshenko D.L. [1,3], Parshin P.D.[1], Virolainen T.S.[1], Kovalevsky R.P. [1], Chubar T.A.[1,3], Boiko K. [2], Eldarov M.[2], Savin S.S. [1,3]

[1]Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; Leninskie gory Str., 1/3, Moscow, 119991, Russian Federation
[2]Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of RAS, Moscow, Russian Federation; Leninskiy prospect Str., 33/2, Moscow, 119071, Russian Federation
[3]Innovations and High Technologies MSU Ltd, Moscow, Russian Federation; Tsymlyanskya Str., 16–96, Moscow, 109559, Russian Federation
e-mail: vitishkov@gmail.com
e-mail: zarubina.sophia@gmail.com

Enzymes as well as whole cells are introduced in biocatalytic processes with increased speed. Development of genetic and protein engineering resulted in new paradigm of biocatalysts creation In present report we will describe some approaches and show real examples.

Key words: biocatalysts, genetic engineering, rational design, bioinformatics

Classic way of biocatalyst preparation included wide screening of different sources of enzymes. It is extensive and expensive way. Sequencing of genomes and development of bioinformatic approaches accelerated speed of target enzymes. Enzymes found by classic screening very often have different conditions for optimal activity compared to optimal conditions of biocatalytic process. Genetic engineering and ration design give In our laboratory we carry out systematic studies structure-function relationships nad protein design of physiologically important enzymes which are also of high practical interest. In this report we will show the most interesting examples about cloning, expression and protein design of formate dehydrogenases from different planst and moss, D-amino acids oxidase from yeasts T.variabilis and C.boidinii, penicillin acylase.

This work was supported by Russian Science Foundation (grant 16-14-00043) and Russian foundation for basic research (grants 17-04-01469-a, 17-04-01487a, 17-04-01662a).

.....

УДК 577.322.7

АНТИОКСИДАНТНАЯ СТРУКТУРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Розенфельд М.А., Бычкова А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля Российской академии наук, Москва, РФ
119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
e-mail: markrosenfeld@rambler.ru

Представлен обзор действия активных форм кислорода на ряд плазменных белков (α2-макроглобулин, сывороточный альбумин человека, фибриноген, фибринстабилизирующий фактор). Представлены аргументы в пользу гипотезы о существовании антиоксидантных структурных элементов в составе белков. Впервые делается акцент на запрограммированное окисление белков.

Ключевые слова: белки плазмы крови, активные формы кислорода, свободнорадикальные процессы

Белки крайне подвержены действию окислителей. Окислительные модификации белков вызывают повреждения их структуры и функциональности. Это означает, что структура белков не обладает способностью к полной антиоксидантной защите. Для клеточных белков механизмы защиты от окислительных повреждений преимущественно связаны с большим разнообразием антиоксидантных ферментативных систем. В противоположность клеточным белкам, белки плазмы крови слабо защищены антиоксидантными ферментативными системами, поэтому механизм их функционирования в условиях постоянной ге-

нерации активных форм кислорода (АФК) кажется более сложным. Нами выдвинута гипотеза, согласно которой трехмерная структура плазменных белков эволюционно адаптирована к окислению. Для защиты от токсического действия АФК и сохранения функциональных свойств в структуре белков существуют антиоксидантные структурные элементы. Различные антиоксидантные элементы структуры (отдельные субдомены, домены, области и полипептидные цепи белков) могут играть роль перехватчиков АФК, таким образом смягчая действие АФК на ключевые (с точки зрения функциональной активности) аминокислотные остатки белков. В настоящей работе выполнен анализ окислительных модификаций ряда плазменных белков, таких как α2-макроглобулин, сывороточный альбумин человека, фибриноген, фибрин-стабилизирующий фактор, которые сильно отличаются по своей пространственной структуре и функциям. Представлены аргументы в пользу гипотезы о существовании антиоксидантных структур. Обнаружение антиоксидантных структур в белках плазмы способствует пониманию механизма изменения функциональных белков, подвергающихся действию АФК. Впервые делается акцент на запрограммированное окисление белков.

Работа по исследованию окислительной модификации фибринстабилизирующего фактора выполняется при финансовой поддержке РФФИ (грант 15-04-08188а).

UDC 577.322.7

ANTIOXIDANT STRUCTURAL EVOLUTION OF PLASMA PROTEINS

Rosenfeld M.A., Bychkova A.V.

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia
e-mail: markrosenfeld@rambler.ru

The review on the effect of reactive oxygen species on blood plasma proteins (α2-macroglobulin, serum human albumin, fibrinogen, and fibrin-stabilizing factor) is presented. The arguments consistent with the possibility of existing hypothetical antioxidant are given. For the first time, emphasis is being placed on the programmed mechanism of protein oxidation.

Key words: blood plasma proteins, reactive oxygen species, free radical processes

Proteins represent an extremely susceptible target for oxidants. Oxidative modification of proteins may give rise to violating their structure and functionality. It implies that the structures of proteins are not infallible in terms of the ability of proteins to antioxidant defense. The defense mechanisms of preventing oxidative damage for proteins localized within cells are mainly related to a large variety of antioxidant enzymatic systems. In contrast to the intracellular proteins, plasma proteins are scarcely protected by antioxidant enzymatic systems, so the mechanism of their functioning in the conditions of continuously generating reactive oxygen species (ROS) seems to be much more complicated. We put forward a hypothesis that the three-dimensional structure of plasma proteins has been evolutionarily adapted to oxidation. To have well-developed defense mechanism against ROS toxicity and retain the ability to optimal functioning, plasma proteins have been forced to create antioxidant structural elements. Various antioxidant elements (distinct subdomains, domains, regions, and polypeptide chains) may act as scavengers or interceptors of ROS, thus mitigating ROS action on functionally crucial amino acid residues of proteins. In the current review, we analyze the oxidative modifications of certain plasma proteins, such as α2-macroglobulin, serum human albumin, fibrinogen, and fibrin-stabilizing factor, which differ drastically in their spatial structures and functions. We will present arguments that are consistent with the possibility of existing hypothetical antioxidant structures. The detection of antioxidant structures in plasma protein is essential to gain a better understanding in changing functionality of proteins exposed to ROS action. For the first time, emphasis is being placed on the programmed mechanism of protein oxidation.

The study of fibrin-stabilizing factor was supported by RFBR, research Project no. 15-04-08188a.

УДК 577.152

ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ – МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю., Модестова Ю.А., Смирнова Д.В.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия,
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, строение 3
e-mail: nugarova@gmail.com

Представлен обзор результатов авторов и литературные данные по механизму действия люциферазы светляков, получению мутантных форм фермента с измененными спектрами биолюминесценции и повышенной термостабильностью, даны примеры биоаналитического использования фермента.

Ключевые слова: люцифераза светляков, мутантные формы, спектры биолюминесценции, термостабильность, гибридные белки, BRET-системы.

Люцифераза светляков состоит из двух доменов: большого N-домена и малого С-домена, - взаимная локализация которых играет ключевую роль в люциферазном катализе. Известно, что в ходе реакции фермент поочередно принимает две конформации: 1) аденилирующую на стадии образования люциферил-аденилата; 2) окисляющую на стадии его окисления. С использованием компьютерных моделей структур люциферазы в двух различных конформациях выявлены участки белка, локализованные вне активного центра, на которых возможно образование междоменных связей, стабилизирующих взаимное расположение доменов в той или иной конформации. Методами генетической инженерии получены данные, которые подтверждают наше предположение о том, что аденилирующая конформация характерна для структуры люциферазы не только на стадии образования люциферил-аденилата, но и в момент испускания света и является существенно более стабильной, чем окисляющая конформация.

Методами сайт-направленного и случайного мутагенеза получены люциферазы с измененными спектрами биолюминесценции. Показана важная роль ряда аминокислотных остатков малого С-домена в стабилизации желто-зеленого эмиттера. Получены мутантные формы люциферазы, термостабильность которых в десятки раз превосходит термостабильность исходного фермента. На базе этих мутантов созданы и широко используются высокоактивные и стабильные реагенты для определения АТФ.

Даны примеры получения и использования гибридных белков и конъюгатов на основе люциферазы светляков в биоспецифическом анализе различных метаболитов, антигенов, клеток микроорганизмов и ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Гранты 11-04-00698, 15-04-01193, 15-04-09197) .

UDC 577.152

FIREFLY LUCIFERASE. MOLECULAR MECHANISMS, GENETIC ENGINEERING, AND APPLICATIONS

Ugarova N.N., Lomakina G. Yu., Modestova Yu., Smirnova D.V.

Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: nugarova@gmail.com

The report summarizes the authors' results and literature data on the action mechanism of firefly luciferase, describes the identification of mutant forms with altered bioluminescence spectra and increased thermal stability, and exemplifies the bioanalytical application of the enzyme.

Key words: firefly luciferase, mutant forms, bioluminescence spectra, thermal stability, fusion proteins, BRET systems.

Firefly luciferase is comprised of two domains: a large N-domain and a small C-domain. Their mutual spatial arrangement plays a key role in the catalysis. Over the course of the reaction, the enzyme successively adopts

two conformations: the adenylation conformation is required to form luciferyl adenylate, whereas the oxidation conformation corresponds to its subsequent oxidation. We studied the color-shifting mutations of the C-domain and the mutations that prevent the formation of the interdomain hydrogen bonds in different protein conformations. The obtained data agrees with our hypothesis that the emission of light occurs from the adenylation conformation and that this conformation is energetically favorable for the enzyme.

Using site-directed and random mutagenesis, we obtained firefly luciferases with altered bioluminescence spectra. We demonstrated that several C-domain residues play an important role in the stabilization of the yellow-green emitter. Mutant forms of firefly luciferases the thermal stability of which is tens of times higher than that of the parent enzyme are available. Based on these mutants, highly active and stable reagents were developed for the ATP assay.

Luciferase-based fusion proteins and conjugates were developed and successfully used in biospecific assays of different metabolites, antigens, cells of microorganisms, and DNA.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects no. 11-04-00698, 15-04-01193, and 15-04-09197).

УДК 544.165

QM-MM ОПИСАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ В ФЕРМЕНТАТИВНОМ КАТАЛИЗЕ

Коц Е. Д.[1,2], Хренова М. Г.[1], Лущекина С. В.[2], Варфоломеев С. Д.[1,2], Немухин А. В.[1,2]

[1]Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, РФ
Москва 119991, Ленинские горы 1, строение 3
[2]Институт Биохимической Физики РАН им. Н. М. Эмануэля, Москва, РФ
Москва, 119334, Косыгина 4.
e-mail: kots.katya@gmail.com

В данной работе методы молекулярной динамики были применены для изучения гидролиза метаболита н-ацетиласпартата (НАА) ферментом аспартоацилазой (АспА), дисфункция которой сопутствует таким неврологическим заболеваниям, как болезнь Альцгеймера, шизофрения и рассеянный склероз.

Ключевые слова: аспартоацилаза, метод КМ-ММ, каталитический цикл, молекулярная динамика

Для построения полного каталитического цикла цинк-зависимого фермента АспА были проведены квантово-механические расчёты (КМ-ММ) химических стадий гидролиза. Расчёт профилей свободной энергии для стадий образования белок-субстратного комплекса и выхода продуктов в раствор был осуществлён методом HREMD (Hamiltonian Replica-Exchange Molecular Dynamics).

Полученный энергетический профиль полного цикла гидролиза NAA позволяет предположить, что скорость лимитирующая стадия процесса не образование тетраэдрического интермедиата в активном сайте АспА, а выход продуктов в раствор. Значение kcat, вычисленное по модели энергетического цикла, составило 6 с-, что согласуется с литературными данными (12.7 с-).

По результатам проделанной работы опубликована рукопись Modeling the complete catalytic cycle of Aspartoacylase / E. Kots., M. Khrenova, et al.// Journal of Physical Chemistry B. – 2016. – Vol. 120, no. 18. – P. 4221 - 4231.

По данным кинетических экспериментов, при повышенных концентрациях НАА проявляет способность к самоингибированию. Различными методами молекулярного моделирования было локализовано возможное положение побочного связывания НАА с АспА и полуколичественно описан механизм аллостерической регуляции фермента с применением методов сетевого анализа молекулярно-динамических траекторий. На основе полученных данных были построены пути передачи аллостерического сигнала от побочного сайта связывания на поверхности белка до активного сайта фермента. Подготовлена рукопись Role of the Protein Dimeric Interface in Allosteric Control of N-Acetyl-Aspartic Acid Hydrolysis by Human Aspartoacylase / E. Kots, S. Varfolomeev, et al., находящаяся на рецензии в журнале Journal of Chemical Information and Modeling.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-13-00124).

UDC 544.165

QM-MM MODELING OF CATALYTIC CYCYLES IN BIOCATALYSIS

Kots E. D.[1,2], Khrenova M. G.[1], Lushchekina S. V.[2], Varfolomeev S. D.[1,2], Nemukhin A. V.[1,2]

[1]M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Lenin's Hills, 1/3, Moscow, 119991, Russia
[2]Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow, Russia
Kosygina, 4, Moscow, 119334, Russia
e-mail: kots.katya@gmail.com

Modern methods of molecular dynamics were applied to elucidate the hydrolysis mechanism of one most abundant metabolites in human brain N-acetylaspartate (NAA) by Aspartoacylase (hAsp) enzyme. The hAsp dysfunction is observed in such neurodegenerative disorders as Canavan Disease, Alzheimer's disease, schizophrenia and multiple sclerosis.

Key words: aspartoacylase, QM MM modeling, catalytic cycle, molecular dynamics

The reaction energy profile of chemical stages of NAA hydrolysis was characterized with quantum mechanics / molecular mechanics (QM/MM) approach, assisted by dynamical simulations with QM/MM potentials. The stages corresponding to substrate binding to the active site and release of the products were modeled with Hamiltonian Replica-Exchange Umbrella Sampling (HREMD-US) molecular dynamics technique.

The constructed free energy diagram from the reactants to the products suggests that the enzyme regeneration, but not the nucleophilic attack of the catalytic water molecule, corresponds to the rate-determining stage of the full catalytic cycle of ASPA. According to catalytic energetic span model computed kcat value resulted in 6 s-1 which is in a good agreement with experimental value of 12.7 s-1.

The results were published in an article Modeling the complete catalytic cycle of Aspartoacylase / E. Kots., M. Khrenova, et al.// Journal of Physical Chemistry B. – 2016. – Vol. 120, no. 18. – P. 4221 - 4231.

Recently experimental evidences showed that aspartoacylase substrate inhibition is observed at relatively high substrate concentrations which could be an evidence of allosteric self-inhibition. . In this work, we present a computational protocol to (i) locate the allosteric binding site, (ii) characterize the structural framework, (iii) define atomistic details of substrate mixed inhibition mechanism and (iv) characterize pathways of propagation of conformational perturbations caused by allostery. The paper Role of the Protein Dimeric Interface in Allosteric Control of N-Acetyl-Aspartic Acid Hydrolysis by Human Aspartoacylase / E. Kots, S. Varfolomeev, et al., is under review in Journal of Chemical Information and Modeling.

The work was financially supported by RFBR (grant No. 14-13-00124).

.....

УДК 579.222.7

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Шевелев А.Б., Бирюкова Ю.К., Трубникова Е.В., Дерябина Ю.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, РФ
119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
e-mail: shevel_a@hotmail.com

Представлены дынные о разработке новой экономически обоснованной технологической платформы для получения ферментов кормового назначения, инкапсулированных внутри клеток дрожжей Y. lipolytica.

Ключевые слова: кормовой белок, кормовые ферменты, премиксы, фитаза, Y. lipolytica

Особенностью дрожжей Yarrowia lipolytica является наличие пероксисом, придающих им способность метаболизировать различные органические соединения липофильной природы: парафины, микотоксины, гидропероксиды и ксенобиотики, предпочитая их полисахаридам и белкам. Y. lipolytica использовалась

в СССР в качестве биореактора для производства кормового белка, где субстратом служили парафины нефти и газа (паприн и гаприн). В результате этого накоплены данные, подтверждающие безопасность и кормовую ценность биомассы Y. lipolytica. Нами проведены успешные испытания биологической безопасности биомассы Y. lipolytica, получаемой при культивировании на мясокостной муке с превышением ПДК по микотоксинам.

В настоящее время проводятся испытания технологии на основе Y. lipolytica, позволяющей конвертировать бракованное кормовое сырье и отходы в ценный кормовой белок, обогащенный кормовыми гидролазами, в частности, фитазами B. subtilis и Obesumbacterium proteus. Целесообразность использования Y. lipolytica для производства микроинкапсулированных ферментов обусловлена следующими обстоятельствами. В производстве комбикормов повсеместно используются ферменты, повышающие усвояемость зерна и других ингредиентов. Гранулирование комбикормов проводится на распылительной сушке при температуре ~70∞С. Получение премиксов заставляет подвергать сушке в тех же условиях и ферменты. Таким образом, для кормового производства оказываются пригодными только термостабильные гидролазы. Термостабильность не существенна при функционировании ферментов в ЖКТ животных. Таким образом, ради повышения технологичности кормопроизводства приходится отбирать ферменты со свойствами, неоптимальными при работе в ЖКТ животных. Нейтрофильные фитазы B. subtilis и O. proteus по pH оптимума и удельной активности идеально подходят для работы в ЖКТ животных, но недостаточно термостабильны. Инкапсуляция их в цитоплазме клеток Y. lipolytica придаёт им устойчивость к кратковременному прогреву в процессе кормопроизводства. Выход инкапсулированной фитазы в расчёте на мл культуральной среды уступает выходу секретируемого в среду фермента. Однако, комбинирование ферментной и белковой добавки в одном и том же исходном материале, имеющим низкую себестоимость, делает экономически обоснованным использование её в кормах в дозировке ~5%, а не ~0,01%, как в случае очищенных секреторных ферментов. Производство инкапсулированного фермента является безотходным: биомасса продуцента и остаток белка из среды не попадают в стоки и отходы, а используются в кормах. Инкапсуляция фитазы в клетках защищает от её деградации в желудке животного: солюбилизация содержимого клеток и высвобождение фермента происходит только в двенадцатиперстной кишке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания Министерства образования и науки РФ ФГБОУ ВО «Курский государственный университет» № 40.2713.2017/ПЧ.

UDC 579.222.7

CELL TECHNOLOGIES OF PRODUCING ENCAPSULATED ENZYMES

Shevelev A.B., Biriukova I.K., Trubnikova E.V., Deryabina Y.I.

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
Kosygina st., 4, Moscow, 119334, Russia
e-mail: shevel_a@hotmail.com

Data about development of a new economically affordable technological platform for producing micro-encapsulated fodder enzymes in yeast Y. lipolytica are reported.

Key words: feeding protein, fodder enzymes, premix, phytase, Y. lipolytica

Yeast Yarrowia lipolytica is characterized with peroxisomes which confer on them an ability to metabolize lipophilic organic compounds (paraffins, mycotoxins, hydroperoxides and xenobiotics) rather than polysaccharides and proteins. Y. lipolytica was exploited in the USSR as a bioreactor for producing feed protein using oil and gas paraffins (paprin and gaprin). As a results, an extensive datasheet about safety and feeding value of Y. lipolytica has been accumulated. We carried out biological trials demonstrating biological safety of Y. lipolytica, biomass produced on meat and bone meal with exceeded mycotoxin contents.

Now we carry out biological trials of a technology based on Y. lipolytica, providing bioconversion of defective feed raw materials and waste to valuable feed protein enriched with feed hydrolyses e.g. phytases from B. subtilis и Obesumbacterium proteus. Rationale of using Y. lipolytica for manufacturing micro-encapsulated enzymes is caused by following conditions. Feed enzymes accelerating assimilation of grain nutrients and other feed stocks are broadly used. Granulation of the mixed fodders is carried out by spray drying at 70∞C. Producing premixes exposes the feeding enzymes to the same heating. Therefore, thermostable hydrolases become the only suitable for the fodder production. However, thermostability is not essential in the gastrointestinal tract of animals. Hence,

technological requirements make to select feeding enzymes with properties inadequate to work in the animal gastrointestinal tract. By their pH-optimum and molar activity neutrophile phytases from B. subtilis and O. proteus are quite suitable for working in the gastrointestinal tract, however they are not thermostable. Encapsulation of these in the cytoplasm of Y. lipolytica endow them a resistance to a short-term heating in the course of the feeding production. Yield of the encapsulated phytase recalculated per ml of the culture is much less then in a secreted enzyme. However, combination of the enzymes and a protein supplement in the same substance having a low manufacturing cost makes affordable its using in the fodders in a dosage of 5%, not ~0,01% as in the purified secreted enzymes. Manufacturing the encapsulated enzyme is wasteless since the biomass of the yeast as well as the residual protein from the substrate are not discarded but fall into the fodder. Encapsulation of the phytase protects it from premature contact with acid and pepsin in the stomach since solubilization of the yeast cell wall and release of the phytase occurs only in the duodenum.

The work was financially supported by a state assignment of Russian Ministry of Education and Science to Kursk State University, № 40.2713.2017/PC

УДК 577.152.31

ЭСТЕРАЗНЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА КАК БИОМАРКЕР ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Г.Ф. Махаева, Е.В. Рудакова, Н.П. Болтнева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, Россия
142432, Черноголовка, Московской области, Северный проезд 1
e-mail: gmakh@ipac.ac.ru

Показано, что эстеразный статус организма может быть использован в качестве комплексного биомаркера воздействия фосфорорганических соединений, что позволяет осуществить более корректную диагностику отравления.

Ключевые слова: эстеразы крови, эстеразный статус, фосфорорганические соединения

Разработка биомаркеров воздействия антихолинэстеразных соединений, в том числе фосфорорганических соединений (ФОС), на человека и их квантификация является важнейшим компонентом системы предсказания и ранней диагностики вызываемых ими заболеваний. Эстеразы могут служить важными маркерами ряда функциональных изменений организма, в том числе патологий, вызванных контактом с ФОС. Нами была предложена концепция «эстеразного статуса» организма как совокупности активностей эстераз крови, с которыми взаимодействуют ФОС. Это ацетилхолинэстераза (АХЭ), бутирилхолинэстераза (БХЭ), нейротоксичная эстераза (НТЭ), карбоксилэстераза (КЭ), параоксоназа (PON1).

В опытах на животных мы показали, что эстеразный статус может быть использован в качестве комплексного биомаркера воздействия антихолинэстеразных соединений. Этот комплексный биомаркер является более эффективным и информативным по сравнению с стандартным определением активностей отдельных ферментов – БХЭ плазмы, АХЭ эритроцитов и НТЭ лимфоцитов, поскольку оценка эстеразного статуса позволит сразу определить: 1) подвергался ли человек вообще воздействию ФОС, 2) оценить характер воздействия – дискриминировать острую и отставленную нейротоксичность, 3) оценить степень воздействия, что важно для последующей терапии.

Учитывая, что на активность отдельных анализируемых эстераз может влиять как их генетический полиморфизм, так наличие у человека ряда заболеваний, определение эстеразного статуса для диагностики отравления антихолинэстеразными соединениями приобретает особое значение, т.к. позволит с большей вероятностью исключить фальш-положительные результаты. Обсуждаются методы оценки эстеразного статуса и различные аспекты его применения для биомедицинской диагностики.

Литература:

1. *Makhaeva G.F., Rudakova E.V., Boltneva N.P., Sigolaeva L.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Richardson R.J. Blood Esterases as a Complex Biomarker for Exposure to Organophosphorus Compounds. In: Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in the East Europe Countries. — Ed. Dishovsky C., Pivovarov A.,— Springer, 2009. — P. 177-194.*
2. *Makhaeva G.F., Rudakova E.V., Sigolaeva L.V. Investigation of esterase status as a complex biomarker of exposure*

to organophosphorus compounds. In: Toxicological Problems. — Ed. Dishovsky Ch., Radenkova-Saeva J., — Sofia: Military Publishing Ltd., 2014. — P.15-26.
3. *Boltneva N.P., Rudakova E.V., Sigolaeva L.V., Makhaeva G.F. Esterase Status of Various Species in Assessment of Exposure to Organophosphorus Compounds. In: Toxicological Problems. — Ed. Dishovsky Ch., Radenkova-Saeva J., — Sofia: Military Publishing Ltd., 2014. — P.27-38.*
4. *Rudakova E.V., Sigolaeva L.V., Makhaeva G.F. (2014) Investigation of Mice Blood Neuropathy Target Esterase as Biochemical Marker of Exposure to Neuropathic Organophosphorus Compounds. In: Toxicological Problems. — Ed. Dishovsky Ch., Radenkova-Saeva J., — Sofia: Military Publishing Ltd., 2014. — P.39-50.*
5. *Kurochkin I.N., Sigolaeva L.V., Eremenko A.V., Dontsova E.A., Gromova M.S., Rudakova E.V. and Makhaeva G.F. (2014) Layer-by-layer electrochemical biosensors for blood esterases assay. In: Toxicological Problems. — Ed. Dishovsky Ch., Radenkova-Saeva J., — Sofia: Military Publishing Ltd., 2014. — P.51-67.*

UDC 577.152.31

ESTERASE STATUS OF ORGANISM AS BIOMARKER OF EXPOSURE TO ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

G.F. Makhaeva, E.V. Rudakova, N.P. Boltneva

Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia
142432, Chernogolovka, Moscow Region, Severny proezd 1
e-mail: gmakh@ipac.ac.ru

It was shown that the esterase status of an organism can be used as a complex biomarker of exposure to anticholinesterase compounds, which provides a correct diagnosis of poisoning.

Key words: blood esterases, esterase status, organophosphorus compounds

Development of biomarkers of human exposures to anticholinesterase compounds including organophosphorus compounds (OPCs) and their quantification is a vital component of a system of prediction and early diagnosis of induced diseases. Esterases can serve as important markers of a number of functional changes in an organism body, including the pathologies caused by contact with the OPCs. We have proposed the concept of «esterase status» of an organism as a set of activities of blood esterases, which interact with OPC. They include acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), neuropathy target esterase esterase (NTE), carboxylesterase (CaE), paraoxonase (PON1).

In animal experiments we have shown that the esterase status can be used as a complex biomarker of exposure to anticholinesterase compounds. This comprehensive biomarker is a more effective and informative as compared to the standard determination of the activities of specific enzymes: plasma BChE, RBC AChE and lymphocyte NTE, since the evaluation of esterase status will allow us: 1) to assess an exposure as such; 2) to determine if the exposure was to agents expected to produce acute and/or delayed neurotoxicity; 3) to perform dosimetry of the exposure, which provides valuable information for medical treatment.

Considering that the activity of certain esterase analyzed can affect both their genetic polymorphism and the presence of a number of human diseases, the determination of esterase status for the diagnosis of poisoning by anticholinesterase compounds is of particular importance, since it will help to prevent false-positive results. The methods of esterase status evaluation and various aspects of its application to biomedical diagnostics are discussed.

References:
1. *Makhaeva G.F., Rudakova E.V., Boltneva N.P., Sigolaeva L.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Richardson R.J. Blood Esterases as a Complex Biomarker for Exposure to Organophosphorus Compounds. In: Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in the East Europe Countries. — Ed. Dishovsky C., Pivovarov A.,— Springer, 2009. — P.177-194.*
2. *Makhaeva G.F., Rudakova E.V., Sigolaeva L.V. Investigation of esterase status as a complex biomarker of exposure to organophosphorus compounds. In: Toxicological Problems. — Ed. Dishovsky Ch., Radenkova-Saeva J., — Sofia: Military Publishing Ltd., 2014. — P.15-26.*
3. *Boltneva N.P., Rudakova E.V., Sigolaeva L.V., Makhaeva G.F. Esterase Status of Various Species in Assessment of Exposure to Organophosphorus Compounds. In: Toxicological Problems. — Ed. Dishovsky Ch., Radenkova-Saeva J., — Sofia: Military Publishing Ltd., 2014. — P.27-38.*
4. *Rudakova E.V., Sigolaeva L.V., Makhaeva G.F. (2014) Investigation of Mice Blood Neuropathy Target Esterase as*

Biochemical Marker of Exposure to Neuropathic Organophosphorus Compounds. In: Toxicological Problems. — Ed. Dishovsky Ch., Radenkova-Saeva J., — Sofia: Military Publishing Ltd., 2014. — P.39-50.
5. *Kurochkin I.N., Sigolaeva L.V., Eremenko A.V., Dontsova E.A., Gromova M.S., Rudakova E.V. and Makhaeva G.F. (2014) Layer-by-layer electrochemical biosensors for blood esterases assay. In: Toxicological Problems. — Ed. Dishovsky Ch., Radenkova-Saeva J., — Sofia: Military Publishing Ltd., 2014. — P.51-67.*

УДК 543.9

НАНОРАЗМЕРНЫЕ ПОЛИМЕР/ФЕРМЕНТНЫЕ ПЛЕНКИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ И ДИЗАЙНА БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

Сиголаева Л.В., Гладыр С.Ю., Евтушенко Е.Г., Пергушов Д.В., Курочкин И.Н.

Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119991, Россия
e-mail: lsigolaeva@genebee.msu.ru

Исследованы свойства моно и биферментных биосенсорных систем, сформированных на проводящих поверхностях путем последовательной двухстадийной адсорбции.

Ключевые слова: полиэлектролиты, микрогели, стимул-чувствительность, модификация поверхности, ферменты, биосенсор.

Наноразмерные пленки могут быть сформированы путем последовательной адсорбции полиэлектролитов. Адсорбция во многом определяется состоянием и структурой исходной поверхности и/или адсорбированных ранее полимерных слоев. Те же правила, по-видимому, действуют при электростатической адсорбции ферментов, используемой для их иммобилизации. Это в особенности важно при конструировании биоаналитических устройств, в том числе ферментных биосенсоров, где количество включаемого фермента и сила его связывания влияют на основные сенсорные характеристики, такие как активность и операционная стабильность. Для демонстрации этого были исследованы различные режимы сборки и свойства полимер/ферментных тонких пленок, адсорбированных на проводящие поверхности. Пленки формировались путем двухстадийной последовательной адсорбции полимерного компонента и фермента в различных pH, солевых и температурных режимах. В качестве полимерного компонента использовались сильные/слабые полиэлектролиты, амфифильные ионогенные диблок-сополимеры или полимерные микрогели. Рассматриваются моноферментные системы с равномерно распределенными биомолекулами или биферментные системы с различной пространственной локализацией ферментов. Описываются примеры практического применения. Работа выполнена при финансовой поддержке SFB 985 “Funktionelle Microgele und Mikrogelsysteme” и РФФИ 17-08-01151.

УДК 543.9

NANOSIZED POLYMER/ENZYME FILMS FOR EFFICIENT SURFACE MODIFICATION AND DESIGN OF BIOSENSORS

Sigolaeva L.V., Gladyr S.Yu., Evtushenko E.G., Pergushov D.V., Kurochkin I.N.

Chemistry Department of M.V. Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991, Russia
e-mail: lsigolaeva@genebee.msu.ru

The fabrication regimes and properties of polymer/enzyme thin films formed at conductive substrates via two-steps, sequential adsorption were examined.

Key words: polyelectrolytes, microgels, stimuli-sensitive, surface modification, tyrosinase, choline oxidase, butyrylcholinesterase, biosensor.

Nanosized polymer films can be constructed via alternative electrostatic adsorption of polyelectrolytes. The adsorption is to a great extent determined by the state and structure of initial surface and/or the pre-adsorbed

layers. The same rule is apparently valid for electrostatic adsorption of enzymes used for their immobilization. This is specifically important for a design and fabrication of bioanalytical devices, e.g., biosensors, where the amount of an enzyme incorporated and the strength of its binding influence on basic characteristics, such as activity and operation stability, of these bioanalytical surfaces. To demonstrate this, different fabrication regimes and properties of polymer/enzyme thin films adsorbed onto conductive substrates were examined. The films were formed via two-steps, sequential adsorption of a polymeric component followed by the enzyme adsorption under different pH/salt composition and temperature regimes. Strong/weak linear polyelectrolytes, amphiphilic ionogenic diblock copolymers or microgels were considered as polymeric components to be interacted with enzymes. Monoenzymatic systems with uniformly distributed biomaterial or bienzymatic systems with spatially separated enzymes are discussed. Specific applications to the field of biosensors are described.

Supported by the DFG within SFB 985 “Funktionelle Microgele und Mikrogelsysteme” and the RFBR 17-08-01151.

УДК 579.222.7

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Сенько О.В., Махлис Т.А., Маслова О.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, РФ
Москва 119991, Ленинские горы 1, строение 3
e-mail: elena_efremenko@list.ru

Представлен обзор результатов работы авторов и литературных данных по регуляции процессов получения бактериальной целлюлозы, в том числе с использованием высококонцентрированных популяций клеток в суспензионном и иммобилизованном виде, показаны существенные преимущества последних.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, иммобилизованные клетки, криогель поливинилового спирта.

Бактериальная целлюлоза (БЦ), имеющая природную нанокристаллическую структуру, привлекает к себе большое внимание в связи с возможностью её применения в медицине, пищевой и текстильной промышленности, производстве новых нанокомпозитных материалов и косметических средств. В отличие от растительной целлюлозы, бактериальная не требует отделения и очистки от лигнина и гемицеллюлозы, поэтому процессы ее получения существенно менее дорогостоящие и энергозатратные. Масштаб практического применения БЦ напрямую зависит от разработки процессов, обеспечивающих высокие выходы этого продукта. Показано, что увеличение биокаталитического синтеза БЦ возможно за счет регуляции основных метаболических процессов путем внесения в питательные среды различных добавок (этанола и органических кислот), стимулирующих синтез полимера и снижающих накоплениея глюконовой кислоты, ингибирующей накопление БЦ. Установлено также, что циклический дигуанозинмонофосфат (c-di-GMP), накапливающийся в среде при высоких концентрациях клеток, является аллостерическим активатором фермента синтазы целлюлозы. Таким образом, увеличение синтеза БЦ возможно за счет использования высококонцентрированных популяций клеток, создание и удерживание которых в реакторе возможно за счет их иммобилизации.

Были разработаны эффективные биокаталитические системы для получения БЦ на основе химически стабильной и нетоксичной матрицы криогеля поливинилового спирта, который успешно используется как универсальный носитель для иммобилизации клеток различных микроорганизмов. Установлено многократное преимущество использования такого подхода к получению БЦ в сравнении с суспензионными клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-08-00457).

UDC 579.222.7

BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE

Efremenko E.N., Stepanov N.A., Senko O.V., Makhlis T.A. Maslova O.V.

M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Lenin's Hills, 1/3, Moscow, 119991, Russia
e-mail: elena_efremenko@list.ru

The review of authors' results and known literature data on regulation of bacterial cellulose production processes including use of highly concentrated cell populations in suspended and immobilized forms are discussed, and the advantages of application of cells immobilized in poly(vinyl alcohol) are performed.

Key words: bacterial cellulose, immobilized cells, poly(vinyl alcohol) cryogel

Bacterial cellulose (BC) with natural nanocrystal structure is an attractive object for investigation, since it can be used in medicine, food and textile industry, production of new nanocomposite materials and cosmetic goods. In comparison with plant cellulose the bacterial one does not need in its separation from lignin and hemicellulose, since then the processes of its production are less cost-based. The scale production of BC has direct dependence on the processes guarantying high yields of the product.

It was shown that increase in biocatalytic synthesis of bacterial cellulose is possible owing to regulation of main metabolic processes via introduction of various additives (for instance, ethanol and different organic acids) to nutrient media for stimulation of polymer synthesis and lowering of factors provoking accumulation of gluconic acid, that inhibits BC synthesis. It was revealed, that cyclic di-guanosine monophosphate (c-di-GMP), accumulated in the medium with BC-producing cells being there in high concentrations, plays a role of allosteric activator of enzyme such as BC-synthase. Thus, increase in synthesis of BC can be reached with application of highly concentrated cell populations, which creation and retention in a reactor is possible by the using of cell immobilization.

In this work various effective biocatalytic systems based on the use of chemically stable and non-toxic matrix of poly(vinyl alcohol) cryogel, were developed for production of BC. The use of the cell support that is universal for microorganisms of different kinds for BC production was demonstrated in the form of granules and even big blocks (0.3m x 0.3 m). The possible successful multiple use of cells immobilized in this porous support for BC accumulation was demonstrated, and such system was more productive as compared to suspended cells.

The work was financially supported by RFBR (grant No.16-08-00457).

БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Попов А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля» Российской Академии Наук, г. Москва, ул. Косыгина, 4
anatoly.popov@mail.ru

Более половины производимых в мире синтетических полимеров состоят из полиолефинов. Большая их доля идёт на изготовление изделий краткосрочного использования. Именно они образуют основную часть полимерного мусора. Поэтому актуальным является придание биоразлагаемых свойств полиолефинам. К одному из основных способов модификации относится создание композиций на основе полиолефинов и природных наполнителей. В качестве полиолефинов использовались полиэтилен, полипропилен, сополимеры пропилена с этиленом, этилена с винилацетатом, этилена с октеном-1, а также смеси полиолефинов. Природными наполнителями служили добавки растительного и природного происхождения, относящиеся, в основном, к отходам различных производств. Установлен вклад различных элементов и иерархической структуры наполненных полимерных композиций на динамику биразложения в модельных и природных условиях.

BIODEGRADABLE COMPOSITE MATERIALS

Popov A.A.

Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences
4 Kosygina street, Moscow, 119334, Russia
anatoly.popov@mail.ru

Polyolefins make up more than a half of total world production of plastics. The majority of polyolefins are designed to be used in short-term consumer goods and packaging production. Moreover, polyolefins form most of the waste on the landfills. That is why it is highly important to modify the polyolefins to make it biodegradable. One of the ways to modify polyolefins is the development of composite materials based on polyolefins and natural fillers. Polyethylene, polypropylene, ethylene-propylene copolymers, ethylene-vinyl acetate, ethylene-1-octene copolymer and polyolefin blends were used as polymer matrices. The range of natural fillers, which were the wastes from agriculture and some other productions, were chosen for the composites preparation. The influence of elements of hierarchical structure and the entire structure on dynamics of biodegradation in model and natural conditions was determined.

УДК 577.154.2 + 542.952+ 579.22; 577.152.1

«ЗЕЛЕНЫЕ» ПРОЦЕССЫ ЭТЕРИФИКАЦИИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ АЛИФАТИЧЕСКИМИ СПИРТАМИ С УЧАСТИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ЛИПАЗЫ

Коваленко Г.А.[1,2], Перминова Л.В.[1], Чуенко Т.В.[1], Рудина Н.А.[1], Кузнецов В.Л.[1,2]

[1] Институт катализа СО РАН им. Г.К. Борескова, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 5
[2] Новосибирский государственный Университет, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2
e-mail: galina@catalysis.ru

Проведены систематические исследования гетерогенных биокаталитических процессов этерификации жирных кислот алифатическими спиртами с участием рекомбинантной термостабильной липазы, иммобилизованной путем адсорбции на неорганических носителях и их наноуглерод-содержащих композитах.

Ключевые слова: липаза, неорганические адсорбенты, биокатализаторы, этерификация, эфиры жирных кислот

Иммобилизованные липазы находят применение в органическом синтезе, благодаря их уникальной способности катализировать различные реакции, например, реакции синтеза сложных эфиров жирных кислот в безводных средах органических растворителей, при этом все требования «зеленой» химии полностью выполняются.

В работе проведено систематическое исследование биокатализаторов, приготовленных путем адсорбции липазы из Thermomyces lanuginosus на поверхности неорганических носителей (SiO2, Al2O3, TiO2, углерод), различающихся, прежде всего, химической природой поверхности. Изучены кинетические параметры Михаэлиса-Ментен и специфичность биокатализа адсорбированной липазой в реакции этерификации насыщенных жирных кислот C(4÷18) с алифатическими спиртами C(3÷16).

В результате проведенных исследований показано, что величина адсорбции и свойства (активность и стабильность) приготовленных биокатализаторов в значительной мере определяются химической природой адсорбентов. Например, удельная активность липазы, адсорбированной на мезопористом силикагеле, в несколько десятков раз превышает активность липазы на макропористом углеродном аэрогеле. Приготовленные биокатализаторы отличаются высокой операционной стабильностью; t½.составляет >1 000 ч в периодическом процессе синтеза сложных эфиров жирных кислот в органических растворителях.

UDC 577.154.2 + 542.952+ 579.22; 577.152.1

"GREEN" PROCESSES OF ESTERIFICATION OF FATTY ACIDS WITH ALIPHATIC ALCOHOLS BY IMMOBILIZED LIPASE

Kovalenko G.A.[1,2], Perminova L.V.[1], Chuenko T.V.[1], Rudina N.A.[1], Kuznetsov V.L.[1,2]

[1] Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Av. Akad. Lavrentyeva, 5
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,
630090, Novosibirsk, Pirogova str., 2
e-mail: galina@catalysis.ru

Systematic study on the heterogeneous biocatalytic processes of esterification of fatty acids with aliphatic alcohols using recombinant thermostable lipase immobilized by adsorption on inorganic supports and its nanocarbon-containing composites was carried out.

Key words: lipase, inorganic adsorbents, biocatalysts, esterification, esters of fatty acids

Immobilized lipases are used in organic synthesis due to their unique ability to catalyze, for instance, the formation of fatty acids' esters in non-conventional media of organic solvents, and all requirements of the «green» chemistry are satisfied.

Systematic study was carried out in order to investigate the heterogeneous biocatalysts prepared by adsorption of Thermomyces lanuginosus lipase on the surface of inorganic supports such as SiO2, Al2O3, TiO2, carbon, differing in the chemical nature of the surface. Michaelis-Menten kinetics and specificity of the biocatalysis by the adsorbed lipase were studied in the esterification of saturated fatty acids C(4÷18) with aliphatic alcohols C(3÷16).

The study demonstrated that the adsorption and properties (activity and stability) of the prepared biocatalysts were greatly determined by the chemical nature of the adsorbents. For example, the specific activity of lipase adsorbed on mesoporous silica was found to be several orders larger than the lipase activity in the macroporous carbon airogel. Prepared biocatalysts possessed high operational stability; t½ was more than 1000 h in periodic process of esterification in organic solvents.

.....

УДК 608

АЭРОПОННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ – НОВЫЕ ИСТОЧНИКИ ФЕРМЕНТОВ

Мартиросян Ю.Ц.[1,2]., Америк А.Ю.[1]., Гольдберг В.М.[1]., Гресис В.О.[1]., Мартиросян Л.Ю.[1]

[1]Москва, 119334, ул. Косыгина, д.4. Институт биохимической физики РАН им. Н.М.Эмануэля.
[2]Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д.42. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии.
e-mail: yumart@yandex.ru

Предлагается новый подход к получению ферментов, гормонов, других целевых продуктов растительного происхождения. Интактные или генетически модифицированные растения предлагается выращивать в строго контролируемых условиях аэропонного фитотрона. Преимущества данного способа культивирования заключаются в достижении максимально возможной продуктивности, благодаря оптимизации всех параметров роста и развития растений.

Ключевые слова: аэропонно-фитотронные технологии, трансгенные растения, ферменты.

Успехи в области генетической инженерии биологических объектов открыли новые возможности в использовании растений в качестве биофабрик для получения целевых белков, в том числе фармацевтического применения, таких как антитела, гормоны и ферменты.

Потребность в препаратах растительного происхождения ежегодно стабильно возрастает, несмотря на успехи синтетической химии в производстве биологически активных лекарственных средств. Растительное происхождение имеют около 25% от используемых препаратов, причем наибольшим спросом

пользуются экстракты, изготавливаемые из корней лекарственных растений. Если также учитывать возрастающие потребности пищевой, косметической, сельскохозяйственной и даже химической промышленностей, то становится очевидным необходимость замены растительного дикорастущего сырья, добываемого традиционным способом, на гарантированно получаемую биомассу культивируемых растений, содержащую определенные соединения в достаточном количестве.

В связи с этим возрастает потребность в разработке реально действующих биотехнологических приемов производства растительного материала, содержащего целевой продукт, в строго контролируемых и экологически чистых условиях. К таким приемам можно отнести культивирование интактных или генетически модифицированных растений в контролируемых условиях фитотрона методом аэропоники. Основными причинами, по которым аэропонный способ выращивания целевых растений рассматривается как альтернативный путь получения природных соединений, являются:

- круглогодичное выращивание;
- свободный доступ к корневой системе растений;
- возможность планирования производства, для выпуска необходимых продуктов в заданные сроки и в нужных количествах;
- высокий выход и качество продукции, по сравнению с природным источником.

Биохимический состав растения, качество и количество действующих веществ подвержены значительным колебаниям и зависят от многих причин. Одно и то же растение может содержать разные биологически активные соединения в различных климатических и географических зонах.

В настоящее время нами ведется работа по разработке протокола для получения высокоэффективной транзиентной экспрессии на растениях хрена обыкновенного (Armorácia rusticána) с модельным GUS-геном. Получена уникальная система для экспрессии рекомбинантных белков в растительных клетках, созданная на основе вируса табачной мозаики (THE TMV-BASED VIRAL PRO-VECTOR SYSTEM). Эта высокоэффективная система основана на сборке функциональных вирусных векторов внутри (in planta) растительной клетки из про-векторных модулей. Различные ДНК-модули доставляются в клетку агробактериями и собираются там в необходимые конструкции при помощи сайт-специфических рекомбиназ. Этот процесс очень быстрый (для экспрессии требуется 3-4 дня) и приводит к очень высокому выходу целевого продукта (до 80% от суммарного растворимого белка).

Таким образом, с применением разработанных нами принципиально новых биотехнологических подходов, возможно ускоренное получение биологически активных препаратов растительного происхождения.

УДК 608

AEROPONIC CULTIVATION OF PLANTS: NEW SOURCES OF ENZYMES

Y. Tc. Martirosyan[1,2]., A.Y. Amerik [1], V.V. Goldberg[1], V.O.Gresis[1]., L.Y. Martirosyan[1]

[1]Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences (IBCSP RAS)
[2]All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology
e-mail: yumart@yandex.ru

A new approach is proposed for the production of enzymes, hormones, and other products of plant origin. It is recommended to grow wild type or genetically modified plants in the stringently controlled environment of aeroponic phytotron. This cultivation method has an advantage of achieving the highest possible productivity due to optimization of all parameters necessary for plant growth and development.

Key words: aeroponic-phytotron, technology, transgenic plants, enzymes.

The advances of genetic engineering has opened new opportunities for the use of plants as protein making bio-factories. These methods allow to produce such a pharmaceutical components, as antibodies, hormones and enzymes.

Despite the success of synthetic chemistry in the production of medications, the demand for drugs of herbal origin is steadily increasing every year. About 25% of all drugs have herbal origin, predominantly made from the roots of medicinal plants. In addition, taking into account the growing needs of the food, cosmetic, agricultural and even chemical industries, it becomes evident the urgency to replace the traditional production of raw biological materials with a technology that ensures production of biomass enriched with desirable compounds.

Therefore, there is an urgency to develop a technology for production of plant biomass enriched with the desired product in stringently controlled and clean environment. The aeroponic cultivation of plants in controlled environment of phytotron meets the criteria of such technology. The aeroponics is considered alternative to traditional methods of obtaining biologically active compound due to the following advantages:

- Operation throughout the year
- Easier harvesting in the absence of the soil
- Completely programmable technology, including the time and quantity of the harvest.
- Production of higher quality product.
- Reduced risk of disease and pest infestation.

As we know, the biochemical composition of the plant, quality and quantity of the active substances are subject to significant fluctuations and depend on many factors. In addition, the same plant may contain different biologically active compounds in different geographical and climatic zones. That's why we have developed phytotron complex, using aeroponic systems and related technologies, which allows to neutralize these negative factors. Moreover, there is a possibility to increase the content of the desired products many times through the regulation of gene expression by optimizing the culture medium.

We have been also optimizing Agrobacterium-mediated transformation of plants in the conditions of phytotron.

At present, we are developing methodology for transient expression of genes in Horseradish, (Armorácia rusticána) using the GUS reporting system. We have created a unique system for the expression of recombinant proteins in plant cells, created on the basis of the tobacco mosaic virus (THE TMV-BASED VIRAL PRO-VECTOR SYSTEM). This high performance system is based on the assembly of functional viral vectors inside (in planta) of plant cells from the pro-vector modules. We use agrobacteria to deliver various DNA modules into the cell, where they are assembled to complete vector with the help of a site-specific recombinase. This process requires only 3-4 days and results in a biomass with up to 80% of expressed protein.

Thus, we have developed new biotechnological approaches, allowing faster production of biologically active compounds of plant origin.

УДК 577.151.45 57.037 579.6

БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И ЛИЗОЦИМА В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Левашов П.А.[1], Матолыгина Д.А.[1], Овчинникова Е.Д.[1], Атрошенко Д.Л.[1], Савин С.С.[1], Белогурова Н.Г.[1], Смирнов С.А.[1], Тишков В.И.[1,2], Левашов А.В.[1]

[1]Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3
[2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия 119071, Москва, Ленинский просп., 33 корп. 2
e.mail: levashov@yahoo.com
тел.: +7-903-7770492

Исследована бактериолитическая активность интерлейкина-2 (ИЛ2)и лизоцима в отношении клеток *Escherichia coli* в разных условиях. Выявлено, что глицин и лизин повышают активность лизоцима, но не влияют на активность ИЛ2. Аргинин и глутаминовая кислота активируют ИЛ2 и лизоцим. Милдронат активирует ИЛ2, но не влияет на активность лизоцима.

Ключевые слова: бактериолитическая активность, лизоцим, интерлейкин-2, физиологически активные вещества.

Глицин в концентрации 2 мМ и лизин в концентрации 16 мМ увеличивают активность лизоцима более чем в три раза. При дальнейшем повышении концентрации глицина или лизина активность лизоцима возвращается к исходным значениям. Бактериолитическая активность ИЛ2 в присутствии глицина и лизина при этом не меняется. Как оказалось, в присутствии этих двух добавок лизоцим и ИЛ2 ведут себя различным образом, что свидетельствует о разном механизме действия. Эффект для повышения активности лизоцима при добавлении глицина до сих пор не был описан и литературе. Тем не менее следует отметить, что известны факты, когда глицин повышает эффективность действия различных антимикробных агентов и также сам

может оказывать бактериостатическое действие [1]. Вероятно, данные явления имеют определённую связь с точки зрения механизма молекулярного действия и требуют дальнейшего изучения. В случае и лизоцима, и ИЛ2 наблюдается существенное повышение скорости лизиса бактериальных клеток при концентрации аргинина 10 мМ и выше. Влияние аргинина может состоять из совокупности воздействий, как на фермент, так и на клетки. Одним из аспектов воздействия аргинина может быть то, что он повышает эффективность препаратов лизоцима, препятствуя агрегации белка [2]. Глутаминовая кислота концентрации 15 мМ увеличивает активность и лизоцима и ИЛ2 более, чем в двое. При дальнейшем повышении концентрации глутаминовой кислоты активность меняется незначительно. Возможно, анион глутамата образует комплекс с положительно заряженными группами на поверхности белков, препятствуя непродуктивной сорбции ферментов на клетках [3, 4]. Милдронат увеличивает почти в два раза активность ИЛ2, но не меняет активности лизоцима. Максимум активности ИЛ2 наблюдается при концентрации милдроната 3 мМ. Молекула милдроната структурно схожа с рядом природных биологически активных веществ, например, с γ-бутиробетаином [5, 6], возможно он также структурно схож с некоторым веществом, которое в организме активирует ИЛ2.

И лизоцим и ИЛ2 в настоящее время используются в медицинской практике. Лизоцим используется как антимикробное средство. ИЛ2 используется как регуляторный цитокин при лечении сепсиса и онкологических заболеваний. Новые данные о влиянии различных добавок при действии лизоцима и ИЛ2 могут оказаться очень полезным для понимания способов повышения эффективности действия существующих медицинских препаратов и также для создания новых медицинских препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 15-14-00012).

Литература:
1. *Minami M., Ando T., Hashikawa S.,Torii K., Hasegawa T., Israel D.A., Ina K., Kusugami K., Goto H., Ohta M. // Antimicrob Agents Chemother. 2004. V. 48(10). P. 3782–3788.*
2. *Shah D, Shaikh A.R. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. Vol. 34(1). P. 104-114*
3. *Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова, Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 365–371.*
4. *Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. // Colloids Surf. B. 2011, V. 88. P. 131-133.*
5. *Liepinsh E., Konrade I., Skapare E., Pugovics O., Grinberga S., Kuka J., Kalvinsh I., Dambrova M.J. // Pharm. Pharmacol. 2011. V. 63(9). P. 1195-1201.*
6. *Beitnere U., Dzirkale Z., Isajevs S., Rumaks J., Svirskis S., Klusa V. // Eur. J. Pharmacol. 2014. V. 745. P. 76-83.*

UDC 577.151.45 57.037 579.6

BACTERIOLYTIC PROPERTIES OF INTERLEUKIN-2 AND LYSOZYME IN PRESENCE OF VARIOUS PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Levashov P.A.[1], Matolygina D.A.[1], Ovchinnikova E.D.[1], Atroshenko D.L.[1], Savin S.S.[1], Belogurova N.G.[1], Smirnov S.A.[1], Tishkov V.I.[1,2], Levashov A.V.[1]

[1]Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation
Leninskie Gory, 1-3, 119991 Moscow
[2]A.N.Bach Institute of Biochemistry., Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», RAS, Moscow, Russian Federation
Leninsky prospekt., 33 Bldg. 2, 119071 Moscow
e.mail: levashov@yahoo.com
tel. : + 7-903-7770492

Bacteriolytic activity of interleukin-2 (IL2) and lysozyme against *Escherichia coli* cells was investigated at different conditions. It was found that glycine and lysine increased activity of lysozyme, but did not affect IL-2 activity. Arginine and glutamic acid activated IL2 and lysozyme. Mildronate activates IL-2, but did not affect lysozyme activity.

Key words: bacteriolytic activity, lysozyme, interleukin-2, physiologically active substance.

Recently we have demonstrated that IL-2 can specifically hydrolyze cell wall of some bacteria. In present work we studied influence on IL-2 bacteriolytic activity of some additives which are present in cells. Lysozyme was used a reference bacteriolytic enzyme. Glycine and lysine in a concentrations 2 and 16 mM, respectively, increased lysozyme activity more than three-fold. Further increase of the concentration of glycine or lysine lysozyme activity

resulted in return to initial values of activity. Glycine and lysine did not change bacteriolytic activity of IL-2. Different behavior of lysozyme and IL2 in the presence of these two additives indicates a different mechanism of action of cell wall lysis. The effect of increasing lysozyme activity by adding glycine has not been described literature so far. Nevertheless, it is known that glycine enhances the effectiveness of various antimicrobial agents and also can itself provide a bacteriostatic effect [1]. Probably, these phenomena have a certain connection in terms of the molecular mechanism of action and require further investigation. Both, lysozyme and IL2 activity, increased by arginine at concentrations 10 mM and above. Influence of arginine may consist of a plurality of impacts, both on the enzyme and on cells. One aspect of the impact of arginine may be that it increases the efficacy of lysozyme by preventing aggregation of the protein [2]. Glutamic acid at concentration of 15 mM increased lysozyme and IL2 activity more than two times. With further increasing of glutamic acid concentration activity rises slightly. Perhaps glutamate anion forms a complex with positively charged groups on proteins surface, so it inhibits unproductive sorption of enzymes on bacteria cells [3, 4]. Mildronate increased IL-2 activity almost twice, but does not affect on lysozyme activity. Maximum of IL-2 activity was observed at mildronate concentrations 3 mM. Mildronate molecule structurally similar to some of biologically active substances such as γ-butyrobetaine [5, 6] and it is also possible that some structurally similar to mildronate substance activates the IL-2 in vivo.

Both, lysozyme and IL2, are used in medical practice. Lysozyme is used as antimicrobial agent. IL-2 is used as a regulatory cytokine in the treatment of sepsis and cancer. New data on the effect of various additives on lysozyme and IL2 action can be very helpful in understanding of ways to improve the effectiveness of existing drugs and to create new medicines.

The work was financially supported by the Russian Science Foundation (project № 15-14-00012).

References:

1. *Minami M., Ando T., Hashikawa S.,Torii K., Hasegawa T., Israel D.A., Ina K., Kusugami K., Goto H., Ohta M. // Antimicrob Agents Chemother. 2004. V. 48(10). P. 3782–3788.*
2. *Shah D, Shaikh A.R. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. Vol. 34(1). P. 104-114*
3. *Matolygina D.A., Osipova H.E., Smirnov S.A., Belogurova N.G., Eremeev N.L., Tishkov V.I., Levashov A.V., Levashov P.A. // Moscow Univ. Chem. Bull.. 2015. V. 70. No 6. P. 262–267.*
4. *Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. // Colloids Surf. B. 2011, V. 88. P. 131-133.*
5. *Liepinsh E., Konrade I., Skapare E., Pugovics O., Grinberga S., Kuka J., Kalvinsh I., Dambrova M.J. // Pharm. Pharmacol. 2011. V. 63(9). P. 1195-1201.*
6. *Beitnere U., Dzirkale Z., Isajevs S., Rumaks J., Svirskis S., Klusa V. // Eur. J. Pharmacol. 2014. V. 745. P. 76-83.*

УДК 577.15, 663.15

РОЛЬ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В ПРОЯВЛЕНИИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЦЕЛЛЮЛАЗ PENICILLIUM VERRUCULOSUM

Доценко А.С. 1, 2, Волков П.В.1, Рожкова А.М.1,2, Гусаков А.В.1,2, Синицын А.П.1,2

[1]*ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*
[2]*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва*
E-mail: ansdotsenko@gmail.com, amrojkova@yahoo.com, avgusakoff@yandex.ru

Целлюлазы используются в процессах биоконверсии растительного сырья для осуществления гидролиза полисахаридных компонентов до технических сахаров. В работе изучена роль N-гликозилирования в проявлении каталитических и биохимических свойств основных целлюлаз (ЦБГI и ЦБГII, ЭГII) секретируемого комплекса мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*.

Ключевые слова: биотехнология, целлюлазы, целлобиогидролаза, эндоглюканаза, Penicillium, N-гликозилирование, белковая инженерия, каталитическая активность

Биоконверсия растительного сырья позволяет получать различные коммерчески значимые продукты: органические спирты и кислоты, углеводы и углеводороды, простые и сложные эфиры – из доступных и возобновляемых источников [1]. Целлюлоза является одним из основных компонентов растительного лигноцеллюлозного сырья и главным источником сахаров для микробиологической трансформации [2, 3], поэтому исследование ферментов, катализирующих гидролиз целлюлозы, и улучшение их свойств, представляется перспективным.

Известно, что N-гликозилирование ферментов оказывает значительное влияние на проявление их

каталитических и биохимических свойств [4]. В данной работе была осуществлена белковая инженерия сайтов N-гликозилирования основных целлюлаз: целлобиогидролазы I (ЦБГI), целлобиогидролазы II (ЦБГII) и эндоглюканазы II (ЭГII) секретируемого комплекса мицелиального гриба P. verruculosum, являющегося промышленным продуцентом целлюлаз [5]. В работе получены мутантные формы ЦБГI, ЦБГII и ЭГII P. verruculosum с измененными сайтами N-гликозилирования (методом сайт-направленного мутагенеза остаток аспарагина в составе сайтов N-гликозилирования N-X-S/T был заменен на остаток аланина для удаления N-связанных гликанов) и изучено влияние N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства указанных ферментов.

Для трех исследованных целлюлаз показано, что N-связанные гликаны представляют собой высокоманнозные олигосахариды (Man)0-14(GlcNAc)2. Изменение степени N-гликозилирования ЦБГI, ЦБГII и ЭГII в результате удаления одного из сайтов N-гликозилирования практически не приводило к изменению таких биохимических свойств, как термостабильность, температурные и pH-оптимумы каталитической активности.

В то же время изменение степени N-гликозилирования привело к значительному изменению каталитической активности исследованных целлюлаз. В случае ЦБГI и ЦБГII удаление N-связанных гликанов, расположенных у входа в активный центр ферментов, позволило увеличить их каталитическую активность на 10-30% по отношению к нерастворимому субстрату – микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) – и на 20-150% по отношению к растворимому (и нетипичному для целлобиогидролаз) субстрату – β-глюкану ячменя. Напротив, удаление N-связанных гликанов, расположенных в нижней части каталитического домена ферментов, привело к уменьшению каталитической активности на 15-80% по отношению к МКЦ и на 5-20% по отношению к β-глюкану. В случае ЭГII удаление N-связанных гликанов, расположенных рядом с активным центром фермента, позволило увеличить каталитическую активность фермента на 10-35% по отношению к β-глюкану.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00163).

Литература:

1. *From the Sugar Platform to biofuels and biochemical. Final report for the European Commission Directorate-General Energy N° ENER/C2/423-2012/SI2.673791, April 2015.*
2. *Menon V., Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept // Progress in Energy and Combustion Science. – 2012. – V. 38. – P. 522-550.*
3. *Nanda S., Mohammad J., Reddy S., Kozinski J., Dalai A. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2014. – V. 4. – P. 157-191.*
4. *Beckham G.T., Dai Z., Matthews J.F., Momany M., Payne C.M., Adney W.S., Baker S.E., Himmel M.E. Harnessing glycosylation to improve cellulase activity // Current Opinion in Biotechnology. – 2012. – V. 23, № 3. – P. 338-345.*
5. *Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. Ферментные препараты Penicillium verruculosum для биоконверсии растительного сырья - альтернатива коммерческим препаратам, полученным с помощью грибов рода Trichoderma // Биотехнология. – 2013. – № 3. – С.69-80.*

.....

UDC 577.15, 663.15

THE ROLE OF N-LINKED GLYCOSYLATION IN APPEARING OF CATALYTIC AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF CELLULASES FROM PENICILLIUM VERRUCULOSUM

Dotsenko A.S.1, 2, Volkov P.V.1, Rozhkova A.M.1,2, Gusakov A.V. 1,2, Sinitsyn A.P. 1,2

[1]*Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Moscow*
[2]*M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemical Department, Moscow*
E-mail: ansdotsenko@gmail.com, amrojkova@yahoo.com, avgusakoff@yandex.ru

Cellulases found applications in the processes of bioconversion of plant renewable lignocellulosic feedstock for hydrolysis of polysaccharide components into technical sugars. The research is focused on analysis of the role of N-linked glycosylation in appearing of catalytic and biochemical properties of three major cellulases (CBHI, CBHI, EGII) of the multienzyme system secreted by the fungus *Penicillium verruculosum*.

Key words: biotechnology, cellulase, cellobiohydrolase, endoglucanase, Penicillium, N-linked glycosylation, protein engineering, catalytic activity

Bioconversion of plant lignocellulosic feedstock allows producing a range of commercially important products: alcohols and organic acids, carbohydrates and hydrocarbons, ethers and esters from accessible and renewable sources [1]. Cellulose is one of the major components of lignocellulosic feedstock and the main source of sugars for subsequent microbial transformation [2, 3], therefore investigation of enzymes that catalyze cellulose hydrolysis and improvement of their properties appear promising and perspective.

It is known that catalytic and biochemical properties of enzymes depend on the degree of glycosylation, in particular N-linked glycosylation [4]. In this work protein engineering of N-linked glycosylation sites was carried out for three major cellulases: cellobiohydrolase I (CBHI), cellobiohydrolase II (CBHII) and endoglucanase II (EGII) of the multienzyme system secreted by the filamentous fungus P. verruculosum, the industrial producer of cellulases [5]. A set of mutant forms of CBHI, CBHII and EGII P. verruculosum with modified sites of N-linked glycosylation (an asparagine residue in the N-glycosylation sites having a motif N-X-S/T was replaced by an alanine residue using site-directed mutagenesis in order to remove N-linked glycans), and the influence of N-glycosylation on the catalytic and biochemical properties of the enzymes was investigated.

For the three investigated cellulases it was shown that the N-linked glycans represent variable high-mannose oligosaccharides or the products of their sequential enzymatic trimming, according to the formula (Man)0-14(GlcNAc)2.

The change in the degree of N-linked glycosylation of CBHI, CBHII and EGII, resulting from deleting one of the sites of glycosylation, did not practically lead to changes in the biochemical properties, such as thermostability, temperature- and pH-optima of catalytic activity.

On the other hand, the change in the degree of N-glycosylation led to significant changes of the catalytic activity of the investigated cellulases. In the case of CBHI and CBHII P. verruculosum the removal of N-linked glycans located at the entrance to the active site tunnel of the enzymes allowed to increase their catalytic activity by 10-30% toward insoluble substrate – microcrystalline cellulose (MCC) and by 20-150% toward soluble (and not typical for cellobiohydrolases) substrate – barley β-glucan. On the contrary, the removal of N-linked glycans located at the "bottom" of enzyme catalytic domain resulted in a decrease in their catalytic activity by 15-80% toward MCC and 5-20% toward β-glucan. In the case of EGII P. verruculosum the removal of N-linked glycans located close to the active site cleft allowed to increase the catalytic activity of the enzyme toward β-glucan by 10-35%.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 16-14-00163).

Bibliography

1. *From the Sugar Platform to biofuels and biochemical. Final report for the European Commission Directorate-General Energy N° ENER/C2/423-2012/SI2.673791, April 2015.*
2. *Menon V., Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept // Progress in Energy and Combustion Science. – 2012. – V. 38. – P. 522-550.*
3. *Nanda S., Mohammad J., Reddy S., Kozinski J., Dalai A. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2014. – V. 4. – P. 157-191.*
4. *Beckham G. T., Dai Z., Matthews J. F., Momany M., Payne C. M., Adney W. S., Baker S. E., Himmel M. E. Harnessing glycosylation to improve cellulase activity // Current Opinion in Biotechnology. – 2012. – V. 23, № 3. – P. 338-345.*
5. *Chekushina A.V., Dotsenko G.S., Kondratieva E.G., Sinitsyn A.P. Enzyme preparations from Penicillium verruculosum for bioconversion of plant raw materials is an alternative to commercial preparations obtained using Trichoderma fungi species // Biotechnology in Russia. - 2013. - V.3. - P.69-80.*

УДК: 577.15.1, ББК:

ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ: ЭКСПРЕССИЯ В E.COLI, ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА

С.А.Зарубина, А.А.Пометун, С.С.Савин, В.И.Тишков

ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Россия, 109559, Москва, ул. Цимлянская, 16,
innotech.msu@gmail.com,
+7(495)514-7909

Ген формиатдегидрогезы из дрожжей Ogataea parapolymorpha (OpaFDH) был экспрессирован в клетках E.coli. Рекомбинантная OpaFDH была очищена и охарактеризована. Показано, что OpaFDH обладает высокими кинетическими параметрами и демонстрирует высокую температурную стабильность, уступая только FDH из бактерий Pseudomonas sp.101 и Staphylococcus aureus.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, термотолерантные дрожжи, экспрессия в E.coli, каталитические свойства, очистка, температурная стабильность

Формиатдегидрогеназа (EC 1.2.1.2, FDH) широко используется в биокаталитических процессах для регенерации кофермента NADH или NADPH. Например, компания Degussa (Evonik) разработала процесс получения L-tert-лейцина с использованием FDH для регенерации NADH. Данный процесс вплоть до настоящего времени является самым крупномасштабным процессом хирального синтеза с использованием очищенных ферментов [1].

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования FDH из различных источников [2]. Недавно нами был клонирован ген новой NAD+-зависимой формиатдегидроненазы из термотолерантных метилотрофных дрожжей OgataeaparapolymorphaDL-1 (OpaFDH) (идентификатор в базе данных GenBank: GCA_000187245.3).

В рамках настоящей работы проведена экспрессия, очистка и функциональная характеристика wt-OpaFDH. Был достигнут выход целевого фермента более 1 г с литра среды. Были определены кинетические параметры. Температурная стабильность была изучена с помощью двух подходов: 1) по кинетике термоинактивации при различных температурах, концентрациях фосфатного буфера, значениях pH и 2) дифференциальной сканирующей калориметрии. Было показано, что OpaFDH имеет самые низкие значения констант Михаэлиса (KM) по обоим субстратам среди всех известных в настоящее время FDHиз бактерий и дрожжей. Фермент демонстрирует высокую температурную стабильность, уступая только FDH из бактерий Pseudomonassp.101 и Staphylococcusaureus.

Синтетический ген OpaFDHтакже был клонирован в работе [3]. Отличительной особенностью этого рекомбинантного фермента является наличие дополнительной последовательности из шести остатков гистидинов на С-конце. Сравнение полученных нами данных и результатов YuS. и соавторов [3] показало, что наличие гистидинов приводит к увеличению KM по NAD+ в 6 раз, уменьшает величины kcatв 2 раза и KMпо формиату в 2 раза. Поскольку наиболее важными параметрами для практического использования FDHявляются kcatи KM по NAD+, то фермент китайских авторов по своим свойствам значительно уступает наши препаратам OpaFDH.

В рамках настоящей работы проведена экспрессия, очистка и функциональная характеристика wt-OpaFDH. Показано, что OpaFDH обладает высокими кинетическими параметрами и демонстрирует высокую температурную стабильность, уступая только FDH из бактерий Pseudomonas sp.101 и Staphylococcus aureus.

Литература: 1. Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., Drauz K. Synthesis and use of enantiometrically pure tert-leucine // Tetrahedron Asymm. 1995. Vol. 6, P. 2851–2888. 2. Tishkov V.I., Popov V.O. Protein engineering of formate dehydrogenase // Biomol Eng. 2006. Vol. 23, P. 89-110. 3. Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W. Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol-assimilating yeast Ogataea parapolymorpha DL-1 in His-tagged form // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. Vol. 98 N 4. P. 1621-1630.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 17-04-01469-а). Авторы выражают благодарность академику О.А. Донцовой за предоставление хромосомной ДНК O.parapolymorpha DL-1.

.....

UDC: 577.15.1, ББК:

FORMATE DEHYDROGENASE FROM THE THERMOTOLERANT YEAST: EXPRESSION IN E.COLI, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

S.Zarubina, A.Pometun, S.Savin, V.Tishkov

Innovations and High Technologies MSU Ltd, Russian Federation, 109559, Moscow, Tsymlyanskya Str., 16

Gene of formate dehydrogenase from the yeast Ogataea parapolymorpha (OpaFDH) was expressed in E.coli. Recombinant OpaFDH was purified and characterized. OpaFDH showed high kinetic parameters and demonstrated high thermal stability which is comparable with FDHs from bacteria Pseudomonas sp.101 and Staphylococcus aureus.

Key words: formate dehydrogenase, thermotolerant yeast, expression in E.coli, kinetic properties, purification, thermal stability.

Formate dehydrogenase (EC 1.2.1.2, FDH) is widely used for coenzyme regeneration of NADH or NADPH in different biocatalytic processes. Company Degussa (now Evonik) developed and introduced biocatalytic process of L-tert-leucine preparation with FDH reduced coenzyme regeneration. Till now this process if the is the largest scale process of chiral synthesis with purified enzymes till now [1].

The research in our laboratory is focused on the systematic study of formate dehydrogenases from different sources [2]. Recently the gene of a novel NAD+-dependent formate dehydrogenase from the thermotolerant methylotrophic yeast Ogataea parapolymorpha DL-1 was cloned (GenBank assembly accession: GCA_000187245.3).

In this work wild-type OpaFDH was overexpressed, purified and characterized. Kinetic parameters were determined. Thermal stability of enzyme was studied 1) through thermal inactivation kinetics at different temperatures, pH values, phosphate buffer concentrations and 2) with differential scanning calorimetry. OpaFDH showed the lowest values of Michaelis constants (KM) both for NAD+ and formate among all described FDHs from yeast and bacteria. The enzyme also demonstrated high thermal stability, which was lower only in comparison with the FDHs from bacteria Pseudomonas sp.101 and Staphylococcus aureus.

A synthetic gene of OpaFDH was also cloned in work [3]. Distinctive feature of this enzyme was a presence of additional six histidines at C-terminus of enzyme. Comparison of our data with results of Yu S. and co-workers shows that the presence of additional histidines results in increase of KM for NAD+ 6-fold, decrease of kcat 2-fold and decrease of KM for formate 2-fold.

In this work wild-type OpaFDH was overexpressed, purified and characterized. OpaFDH showed high kinetic parameters and demonstrated high thermal stability which is comparable with FDHs from bacteria Pseudomonas sp.101 and Staphylococcus aureus.

References: 1. Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., Drauz K. Synthesis and use of enantiometrically pure tert-leucine // Tetrahedron Asymm. 1995. Vol. 6, P. 2851–2888. 2. Tishkov V.I., Popov V.O. Protein engineering of formate dehydrogenase // Biomol Eng. 2006. Vol. 23, P. 89-110. 3. Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W. Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol-assimilating yeast Ogataea parapolymorpha DL-1 in His-tagged form // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. Vol. 98 N 4. P. 1621-1630.

Grant: This work was supported by grant of Russian Foundation for Basic Research (grants 17-04-01469-a). Authors also express special thanks to Academician O.A. Dontsova for kind supplement of O.parapolymorpha DL-1chromosomal DNA.

УДК 577.15.1

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕН ОСТАТКА CYS298 НА СВОЙСТВА ОКСИДАЗЫ DАМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ.

Атрошенко Д.Л.[1,2], Карнаухов В.К.[2], Савин С.С.[1,2], Тишков В.И. [1,2,3]

[1]Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
119991, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3
[2]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва, Россия;
109559, Москва, ул. Цимлянская, д. 16, оф. 96.
[3]ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия;
119071, Москва, ул. Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
e-mail: atrdenis@gmail.com

Получены мутантные оксидазы Dаминокислот из дрожжей Trigonopsis variabilis, содержащие замены цистеина в 298-м положении. Определены их каталитические параметры в реакции окисления цефалоспорина С и исследована их стабильность к окислению пероксидом водорода.

Ключевые слова: оксидаза D-аминокислот, цефалоспорин С, окислительная стабильность, ВЭЖХ

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования взаимосвязи структуры и функции ферментов с помощью метода рационального дизайна. Одним из таких ферментов является оксидаза Dаминокислот из дрожжей Trigonopsis variabilis (TvDAAO). Этот фермент катализирует окисление Dаминокислот в соответствующие α-кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония.

Оксидаза Dаминокислот играет важную физиологическую роль и находит широкое практическое применение. DAAO используется в тонком органическом синтезе оптически активных соединений, αкетокислот, неприродных L-аминокислот и в процессе окисления цефалоспорина С для получения 7аминоцефалоспарановой кислоты (7-АЦК). Среди изученных оксидаз Dаминокислот наилучшими свойствами обладает фермент из дрожжей Trigonopsis variabilis (TvDAAO).

Одним из важных свойств для практического использования ферментов является их операционная стабильность. В случае TvDAAO наиболее значимым является ее устойчивость к окислению пероксидом водорода, так как H2O2 является продуктом реакции. Кроме того, в одном из наиболее крупнотоннажных производств с использованием TvDAAO — получении 7-АЦК, пероксид водорода добавляется в систему для количественного протекания реакции.

В белках наиболее подвержены окислению остатки метионина и цистеина. Пероксид водорода является активным окислителем и, благодаря небольшому размеру, способен проникать вглубь белковой глобулы и окислять малодоступные растворителю остатки. Ранее было изучено влияние замен остатков метионина на каталитические параметры, температурную стабильность и стабильность к окислению пероксидом водорода [1].

В данной работе мы исследовали роль остатка Cys298 в химической стабильности фермента TvDAAO. Был проведен анализ окружения остатка Cys298 и выбраны наиболее подходящие остатки для введения замен. Методом направленного мутагенеза были получены плазмиды с заданными мутациями в гене tvdaao. Мутантные TvDAAO были экспрессированы в клетках E. coli, получены в высокоочищенном виде и охарактеризованы. Была определена кинетика окисления мутантных TvDAAO пероксидом водорода.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-00043) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-04-01487-а).

Литература:
1. Atroshenko D.L., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I.. Influence of Met/Leu Amino Acid Changes on Catalytic Properties and Oxidative and Thermal Stability of Yeast D-Amino Acid Oxidase // Moscow Univ. Chem. Bull. 2016. Vol. 71, № 4, P. 243–252.

UDC 577.15.1

INFLUENCE OF MUTATIONS OF CYS298 ON PROPERTIES OF YEAST DAMINO ACID OXIDASE.

Atroshenko D.L.[1,2], Karnaukhov V.K.[2], Savin S.S.[1,2], Tishkov V.I. [1,2,3]

[1]Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; Leninskie gory Str., 1/3, Moscow, 119991, Russian Federation
[2]Innovations and High Technologies MSU Ltd, Moscow, Russian Federation; Tsymlyanskya Str., 16–96, Moscow, 109559, Russian Federation
[3]Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of RAS, Moscow, Russian Federation; Leninskiy pr., 33/2, Moscow, 119071, Russian Federation
e-mail: atrdenis@gmail.com

Mutant forms of D-amino acid oxidase from the yeast Trigonopsis variabilis were obtained with substitution of cysteine residue in position 298. Their catalytic parameters in the oxidation of cephalosporin C and their stability to oxidation with hydrogen peroxide were investigated.

Key words: D-amino acid oxidase, cephalosporin C, oxidative stability, HPLC

In our laboratory rational design is used to carry out systematic studies of structure-function relationships of practically important enzymes. One of the such enzyme is a Damino acid oxidase from the yeast Trigonopsis variabilis (TvDAAO). This enzyme catalyzes the oxidation of D-amino acids into the corresponding α-keto acids with formation of hydrogen peroxide and ammonium ion. Damino acid oxidase plays an important physiological role and is of wide practical application.

TvDAAO is used in fine organic synthesis of optically active compounds, preparation of αketoacids, unnatural L-amino acids and for oxidation of cephalosporin C in industrial biocatalytic process of 7-aminocephalospranic acid (7-ACA) production.

One of the important properties for practical use of enzymes is their operational stability. In case TvDAAO most

important is its resistance to oxidation by hydrogen peroxide, which is the product of reaction. Moreover, hydrogen peroxide is added to the reaction system for a quantitative reaction in process of 7-ACA preparation.

The methionine and cysteine residues in enzymes are most susceptible to oxidation. Hydrogen peroxide is an active oxidant and, due to its small size, is able to penetrate into the protein globule. So that it can oxidize solvent inaccessible residue of Met and Cys. Recently, influences of substitution of methionine on the catalytic properties, temperature stability and stability to hydrogen peroxide oxidation was studied.

In our work, we investigated the role of Cys298 residue in TvDAAO in the chemical stability of the enzyme. Analysis of Cys298 residue environmental in 3D structure was performed and the most promisimg amino acid changes were selected.. Using the method of directed mutagenesis we prepared TvDAAO plasmids with selected substitutions. TvDAAO mutants were expressed in E.coli cells, purified and characterized. The oxidation kinetics of the mutant TvDAAOs with hydrogen peroxide was determined.

The work is supported by Russian Science Foundation (project 16-14-00043) and Russian Foundation for Basic Research (grant 17-04-01487-a).

References:

1. Atroshenko D.L., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I.. Influence of Met/Leu Amino Acid Changes on Catalytic Properties and Oxidative and Thermal Stability of Yeast D-Amino Acid Oxidase // Moscow Univ. Chem. Bull. 2016. Vol. 71, № 4, P. 243–252.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 547.963.1

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЦИНА

Шолина Е.А., Филатова Л.Ю., Киржанова Е.А., Володькин Д.В., Балабушевич Н.Г.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
e-mail: nbalab2008@gmail.com

Мукоадгезивная система доставки лекарственных веществ получена послойной адсорбцией муцина и протамина на ватеритных микросферах с последующим их растворением. Изучены включение в микрочастицы лекарственных веществ (доксорубицин, апротинин, инсулин) и их высвобождение в физиологических условиях.

Ключевые слова: муцин; ватерит; протамин; послойная адсорбция полиэлектролитов; мукоадгезивные лекарственные формы.

Мукозальное применение лекарственных веществ интенсивно развивается. Мукоадгезивные лекарственные формы способны взаимодействовать со слизистой оболочкой, удерживаясь на ее поверхности продолжительное время, что способствует увеличению биодоступности лекарственных веществ. Муцины (pI 3-4) являются основными компонентами всех слизистых поверхностей, обладают высокой молекулярной массой и содержат до 80% углеводов (галактоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетил-галактозамин, фукоза и сиаловые кислоты) и 20% белка. В белковом стержне различают центральный гликозилированный участок, содержащий преимущественно серин, треонин и пролин, и участки, богатые цистеином, благодаря которым вследствие образования дисульфидных мостиков формируются олигомеры муцина [1].

Метод последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на микросферах $CaCO_3$ активно используется для иммобилизации биологически активных веществ [2]. Такие мезопористые ватеритные микросферы позволяют включать значительные количества лекарственных веществ. После послойного нанесения полиэлектролитов на микросферы и растворения карбонатной матрицы в мягких условиях (ЭДТА) образуются полые полимерные микрокапсулы. В литературе описано использование муцина при послойной адсорбции на плоских поверхностях [3].

Цель работы состояла в получении мукоадгезивных полиэлектролитных микрочастиц, содержащих муцин и лекарственные вещества.

Микросферы ватерита с размером 3-5 мкм стандартно сформированы при смешивании эквимолярных растворов CaCl2 и Na2CO3. Включение муцина в микросферы ватерита проведено как соосаждением при их получении, так и адсорбцией на поверхности готовых микросфер. Изучены кинетика адсорбции муцина и влияние условий на процесс включения.

Проанализированы морфология, стабильность, изменение поверхностного заряда частиц и содержания гликопротеина при послойной адсорбции на микросферах ватерита муцина и полипептида протамина (pI 11). Подобраны условия растворения CaCO3 в готовых полиэлектролитных микрочастицах.

Исследованы включение в микросферы CaCO3 и в полиэлектролитные микрокапсулы известных лекарственных веществ (доксорубицин, апротинин и инсулин), а также кинетика их высвобождения и сохранение активности.

В работе показана возможность получения на основе ватерита содержащих муцин микросфер и полиэлектролитных микрокапсул, перспективных для мукозальной доставки лекарственных веществ.

Литература:
1. *Bansi R., Turner B.S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications// Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2006. Vol.11. P. 164–170.*
2. *Балабушевич Н.Г., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И. Белковые микрочастицы с контролируемой стабильностью, полученные послойной адсорбцией биополиэлектролитов// Высокомол. соединения. 2012. Т. 54. № 7. С. 1116–1129.*
3. *Ahn J., Crouzier T., Ribbeck K., Rubher M.F., Cohen R.E. Tuning the properties of mucin via layer-by-layer assembly// Biomacromol. 2015. Vol. 6. № 1. P. 228–235.*

UDC 547.963.1

DESIGN OF DRUG DELIVERY SYSTEM USING MUCIN

Sholina E.A., Filatova L.Y., Kirzhanova E.A., Volodkin D.V., Balabushevich N.G.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Leninskiye gory 1-3, 119991 Moscow, Russia
e-mail: nbalab2008@gmail.com

Mucoadhesive drug delivery system was prepared by the layer-by-layer adsorption of mucin and protamine on calcium carbonate microspheres (vaterite form) followed by elimination of the microspheres. Drug (doxorubicin, aprotinin, insulin) entrapment into the microparticles and drug release at physiological condition have been studied.

Key words: mucin, vaterite, protamine, polyelectrolyte layer-by-layer adsorption, mucoadhesive drugs.

Mucosal application of drugs is being developed actively. Mucoadhesive drugs are able to interact with mucosa being retained on its surface for a long time that leads to an increase of drug bioavailability. Mucins (pI 3-4) are the main components of all mucosal tissues. They have high molecular weight and contain up to 80% of carbohydrates (galactose, N-acetylglucosamine, N-acetyl-galactosamine, fucose and sialic acid) and 20% of proteins. The protein core is composed of central glycosylated region which mainly contains serine, threonine and proline. It is also composed of cysteine rich regions which are responsible for formation of oligomers of mucin, thanks to disulfide bridges [1].

The layer-by-layer adsorption of oppositely charged polyelectrolytes on CaCO3 microspheres is actively used for immobilization of biologically active substances [2]. These mesoporous vaterite microspheres allow to include a significant amount of drug. Polymer microcapsules are formed after layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes on the microspheres followed by dissolution of the carbonate matrix at mild conditions (EDTA or pH below neutral). The use of mucin for the layer-by-layer adsorption on flat surfaces is described in literature [3].

The aim of this work was to obtain mucoadhesive polyelectrolyte microparticles containing mucin and drugs.

The vaterite microspheres with the size of 3-5 μm were formed according to a standard procedure by mixing of equimolar solutions of CaCl2 and Na2CO3. The inclusion of mucin (source - porcine stomach) into the vaterite microspheres was performed by both i) co-precipitation (mucin added during microsphere preparation) and ii) by adsorption on the surface of prepared mcirospheres. Kinetics of the mucin adsorption is studied and an effect of preparation conditions on the mucin inclusion is evaluated.

Morphology, stability, change of the surface charge of the particles and the content of the glycoprotein were

analyzed for the layer-by-layer adsorption of mucin and protamine (pI 11) on the vaterite microspheres. The conditions of dissolution of the CaCO3 microspheres for the formed polyelectrolyte-coated particles have been found.

The inclusion of conventionally used drugs (doxorubicin, aprotinin, insulin) into the CaCO3 microspheres and into the polyelectrolyte microcapsules, and also the release performance and the preservation of the activity of the encapsulated drugs were investigated.

The possibility of obtaining mucin-containing microspheres and polyelectrolyte microcapsules based on vaterite was shown in the work. The discussed drug delivery systems may be promising for mucosal application.

References:
1. *Bansi R., Turner B.S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications// Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2006. Vol.11. P. 164–170.*
2. *Balabushevich N.G., Izumrudov V.A., Larionova N.I. Protein microparticles with controlled stability prepared via layer-by-layer adsorption of biopolyelectrolytes// 2012. Vol 54. №7. P. 540-551*
3. *Ahn J., Crouzier T., Ribbeck K., Rubher M.F., Cohen R.E. Tuning the properties of mucin via layer-by-layer assembly// Biomacromol. 2015. Vol. 6. № 1. P. 228–235.*

УДК 76.03.31, 577.151.45, 616-097, 616.127-005.8

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКА IGFBP-4 ИНГИБИРУЕТ ЕГО СПЕЦИФИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТЕАЗЫ PAPP-A

Конев А.А., Постников А.Б., Катруха А.Г.

Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биохимии. Москва, Россия.
119234, Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр. 12.
e-mail: konevabiof@rambler.ru

В плазме крови впервые обнаружен гликозилированный N-концевой фрагмент белка IGFBP-4 (NT-IGFBP-4). Гликозилирование не влияет на взаимодействие IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 со специфическими моноклональными антителами, однако ингибирует расщепление IGFBP-4 под действием протеазы PAPP-A.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, прогностический биомаркер, протеолиз, гликозилирование, IGFBP-4, PAPP-A.

Введение. IGFBP-4, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGF), содержится в плазме крови и регулирует доступность IGF для клеточного рецептора. Расщепление IGFBP-4 по специфическому участку металлопротеазой PAPP-A приводит к образованию свободной (активной) формы IGF и протеолитических фрагментов IGFBP-4 (NT-IGFBP-41-135 и CT-IGFBP-4136-237, 14,6 и 11,3 кДа соответственно). Повышение концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в плазме крови свидетельствует о риске осложнения сердечно-сосудистых заболеваний. Часть циркулирующего в кровотоке IGFBP-4 гликозилирована по остатку Asn104, вблизи участка специфического расщепления белка протеазой PAPP-A.

Целью работы было исследование влияния гликозилирования IGFBP-4 на его протеолиз под действием PAPP-A и образование фрагментов NT-IGFBP-41-135 и CT-IGFBP-4136-237.

Методы. Очищенные препараты IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 получали из ЭДТА-плазмы здоровых доноров методом аффинной хроматографии. Разделение гликозилированных и негликозилированных форм проводили на носителе с иммобилизованным конканавалином-А. Идентичность выделенных гликозилированного и негликозилированного NT-IGFBP-4 подтверждали методом масс-спектрометрии. Концентрацию IGFBP-4 и его фрагментов в образцах измеряли методом флуороиммунного анализа (ФИА) сэндвич-типа. Интенсивность PAPP-A зависимого протеолиза гликозилированного и негликозилированного IGFBP-4 in vitro оценивали, измеряя скорость образования NT-IGFBP-41-135 и CT-IGFBP-4136-237. Содержание гликозилированных форм IGFBP-4 в плазме рассчитывали с использованием метода иммуноблоттинга.

Результаты. Из ЭДТА-плазмы были выделены препараты гликозилированных и негликозилированных форм IGFBP-4 и NT-IGFBP-4. Полученные белки проявляют сходную иммунореактивность при их детекции с использованием специфических МАт. PAPP-A зависимый протеолиз гликозилированного IGFBP-4 идет в 3-4 раза медленнее, чем протеолиз негликозилированного белка. Доля гликозилированного NT-IGFBP-4 в общем количестве NT-IGFBP-4 составляет в среднем около 20%, что ниже доли гликозилированного IGFBP-4 в общем количестве IGFBP-4 (более 50%).

Выводы. Таким образом, в плазме крови было подтверждено наличие гликозилированного IGFBP-4 и впервые детектирован и выделен гликозилированный NT-IGFBP-4. Гликозилированные IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 обладают иммунореактивностью, сходной с иммунореактивностью негликозилированных форм. Гликозилированная форма IGFBP-4 является более устойчивой к протеолизу под действием PAPP-A.

UDC 76.03.31, 577.151.45, 616-097, 616.127-005.8

THE GLYCOSYLATION OF IGFBP-4 INHIBITS ITS SPECIFIC PAPP-A DEPENDENT CLEAVAGE

Konev A.A., Postnikov A.B., Katrukha A.G.

Moscow State University, School of biology, biochemistry department, Moscow, Russia.
119234, Moscow, Leninskie Gory, 1-12.
konevabiof@rambler.ru

For the first time the glycosylated form of N-terminal fragment of IGFBP-4 (NT-IGFBP-4) was found in the blood. The glycosylation does not influence the interaction of IGFBP-4 and NT-IGFBP-4 with the specific monoclonal antibodies but inhibits the PAPP-A dependent proteolytic cleavage of IGFBP-4.

Key words: myocardial infarction, prognostic biomarker, proteolysis, glycosylation, IGFBP-4, PAPP-A.

Introduction. IGFBP-4 (insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4) circulates in human blood and regulates the availability of IGF to its cellular receptor. Site-specific cleavage of IGFBP-4 by metalloprotease pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) leads to formation of free (active) IGF and proteolytic fragments of IGFBP-4 (NT-IGFBP-41-135 and CT-IGFBP-4136-237, 14.6 and 11.3 kDa, respectively). It is well known that the raised plasma concentration of NT-IGFBP-4 and CT-IGFBP-4 is associated with major adverse cardiac events (MACE). In addition there are some data suggesting that part of circulating IGFBP-4 contains glycosylated Asn104 which is located near the PAPP-A-specific cleavage site.

The aim of the study was the investigation of circulating glycosylated and non-glycosylated forms of IGFBP-4 and NT-IGFBP-4 levels and interaction with specific monoclonal antibodies.

Methods. IGFBP-4 and NT-IGFBP-4 were purified from pooled EDTA-plasma of healthy donors by affinity chromatography. Concanavalin-A sepharose was used for the separation of glycosylated and non-glycosylated forms of the proteins. The precise masses of purified glycosylated and non-glycosylated NT-IGFBP-4 were confirmed by mass-spectrometry. The concentrations of IGFBP-4 and its fragments in the analytes were measured using sandwich fluoro-immunoassay. The rate of the PAPP-A dependent proteolysis of glycosylated and non-glycosylated IGFBP-4 was analyzed by measuring of the rate of the in vitro formation of NT-IGFBP-41-135 и CT-IGFBP-4136-237. The levels of glycosylated forms of IGFBP-4 in plasma were measured by immunoblotting.

Results. The purified preparations of glycosylated and non-glycosylated IGFBP-4 and NT-IGFBP-4 were extracted from pooled EDTA-plasma. The obtained proteins displayed the same immunoreactivity while detected using specific monoclonal antibodies. PAPP-A dependent cleavage of glycosylated IGFBP-4 is slowed down for 3-4 times if compared with non-glycosylated IGFBP-4. The portion of glycosylated NT-IGFBP-4 in total NT-IGFBP-4 was about 20%, at the same time the portion of glycosylated IGFBP-4 in total IGFBP-4 was significantly higher (more than 50%).

Conclusions. Thus, the presence of glycosylated IGFBP-4 in human circulation was confirmed. For the first time the glycosylated NT-IGFBP-4 was detected and purified from human plasma. The glycosylated IGFBP-4 and NT-IGFBP-4 have the similar immunoreactivities as their non-glycosylated forms. Glycosylated IGFBP-4 is less susceptible to PAPP-A dependent proteolysis than the non-glycosylated form.

УДК 579.66:663.18

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК LACTOBACILLUS PARACASEI ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Шустов М. Д., Белодед А. В., Кузнецов А. Е.

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

Клетки Lactobacillus paracasei, иммобилизованные в кальций-альгинатном геле, криогеле поливинилового спирта и в геле модифицированного поливинилового спирта, использовались в качестве биокатализатора для сбраживания углеводных субстратов в молочную кислоту. Исследована стабильность полимерной матрицы в условиях длительного процесса и определены приемлемые условия проведения иммобилизации и ферментационного процесса.

Ключевые слова: молочная кислота, Lactobacillus paracasei, иммобилизованные клетки микроорганизмов, кальций-альгинатный гель, криогель поливинилового спирта, поперечно-сшитый поливиниловый спирт.

Применение в биотехнологиях иммобилизованных клеток микроорганизмов обладает значительными преимуществами, такими как существенное упрощение операций по отделению продукта, возможность многократного использования иммобилизованного биокатализатора, реализации непрерывных процессов и т.д.

В работе исследовалась возможность использования биокатализатора на основе клеток Lactobacillus paracasei, иммобилизованных в кальций-альгинатном геле, криогеле поливинилового спирта (ПВС) и в геле модифицированного ПВС, для получения молочной кислоты сбраживанием углеводных субстратов. Для сравнения скоростей сбраживания субстрата свободными и иммобилизованными клетками во всех экспериментах использовалась биомасса идентичных 24-х часовых культур молочнокислых бактерий, выращенных на питательной среде Man-Rogosa-Sharpe (MRS) и отмытых от продуктов метаболизма. После иммобилизации соответствующим способом гранулы или блоки биокатализатора помещались в ферментационную среду и инкубировались при температуре 37 оС.

Эксперимент с иммобилизацией клеток в кальций-альгинатном геле показал, что скорости сбраживания субстрата для свободных и иммобилизованных клеток практически совпадают, следовательно, данный способ иммобилизации клеток L. paracasei не приводит к каким-либо ощутимым диффузионным затруднениям для метаболитов. Кроме того, данный способ иммобилизации не влияет на жизнеспособность и бродильную активность клеток.

Исследование стабильности гранул кальций-альгинатного геля в условиях ферментационного процесса показало, что в области высоких концентраций лактата аммония (более 60 г/л) наблюдается постепенное разрушение гранул и выход клеток, поэтому многократное применение такого иммобилизованного биокатализатора невозможно.

Иммобилизация в криогеле ПВС позволяет избежать ионообменных процессов, приводящих к разрушению гелевой матрицы, что наблюдается для кальций-альгинатного геля. Однако вследствие однократных и/или повторных замораживаний в ходе иммобилизации активность культур молочнокислых бактерий заметно снижалась. Для восстановления активности полученного биокатализатора гранулы геля с иммобилизованными клетками инкубировались в богатой среде MRS в течение 24-48 часов при температуре 37 оС. Бродильная активность иммобилизованных культур при этом частично восстанавливалась.

Гелевая матрица ПВС не теряла своих свойств в области высоких концентраций молочной кислоты, лактата аммония, сохраняла механическую прочность в широком диапазоне pH и в ходе длительного процесса, однако недостатком данного способа иммобилизации являлось постепенное вымывание клеток из матрицы носителя в среду. Увеличение концентрации ПВС при иммобилизации с 10 до 15% не влияло на диффузию субстратов и продуктов, активность культуры и позволяло снизить выход клеток в среду, но не устраняло его полностью. Более приемлемые результаты демонстрировала иммобилизация в модифицированном ПВС с формированием поперечных сшивок между молекулами матрицы. Гранулы поперечно сшитого ПВС возможно использовать многократно без существенной потери клеток, снижения бродильной активности биокатализатора и уменьшения механической прочности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 16-19-10469.

UDC 579.66:663.18

PROSPECTS FOR THE USE OF IMMOBILIZED LACTOBACILLUS PARACASEI CELLS IN LACTIC ACID PRODUCTION

Shustov M. D., Beloded A. V., Kuznetsov A. E.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
e-mail: shustoffmax@yandex.ru

Lactobacillus paracasei cells immobilized in calcium alginate gel, polyvinyl alcohol cryogel and modified polyvinyl alcohol gel were used as biocatalyst for carbohydrate substrates fermentation into lactic acid. The stability of the polymer matrix during the durable process was investigated and acceptable conditions for fermentation process and immobilization were defined.

Key words: lactic acid, Lactobacillus paracasei, immobilized cells of microorganisms, calcium alginate gel, polyvinyl alcohol cryogel, cross-linked polyvinyl alcohol.

Application of immobilized cells of microorganisms in biotechnology has significant advantages such as substantial simplification of product separation operations, opportunity for multiple use of the immobilized biocatalyst, capability of continuous process realization etc.

The work investigated the possibility of use of the biocatalyst based on Lactobacillus paracasei cells immobilized in calcium alginate gel, polyvinyl alcohol (PVA) cryogel and modified PVA gel for carbohydrate substrates fermentation to lactic acid. To compare the speeds of substrate fermentation by free and immobilized cells in all experiments biomass of identical 24-hour lactic acid bacteria cultures cultivated on the nutrient Man-Rogosa-Sharpe (MRS) medium and washed from metabolism products were used. After immobilization the granules or the blocks of the biocatalyst were placed in fermentation medium and were incubated at the temperature of 37 oC.

The experiment with cells immobilization in calcium alginate gel showed that speeds of substrate fermentation by free and immobilized cells practically coincide therefore this immobilization method does not lead to any noticeable diffusive difficulties for metabolits. Besides, this immobilization method does not influence cells viability and fermentation activity.

The investigation of calcium alginate granules stability in fermentation process conditions showed that at high concentrations of ammonium lactate (over 60 g/l) the destruction of the biocatalyst granules is observed therefore multiple use of this biocatalyst is impossible.

The immobilization in PVA cryogel allows to avoid ion exchange processes leading to gel matrix destruction which is observed for calcium alginate gel. However due to single and/or multiple freezing in course of immobilization the activity of lactic acid bacteria cultures decreased significantly. To recover the biocatalyst activity the granules of the gel with immobilized cells were incubated in MRS medium for 24-48 hours at the temperature of 37 oC. In this case immobilized cultures fermentation activity was partially recovered.

The gel matrix of PVA did not lose its properties at high concentrations of lactic acid, ammonium lactate, it kept mechanical strength in wide pH range and in the course of durable process however the disadvantage of this immobilization way was gradual cell washing-out from carrier matrix to the medium. The increase of PVA concentration from 10 to 15% did not influence substrate and products diffusion, the culture activity and allowed to increase cells outlet to the medium, but did not eliminate it completely. More acceptable results were demonstrated by immobilization in modified PVA with cross-links between the matrix molecules. Cross-linked PVA granules can be used repeatedly without significant cell loss, decrease of biocatalyst fermentation activity and its mechanical strength. The present study was sponsored by the Russian Science Foundation (Project # 16-19-10469).

УДК 620.193.8

КИНЕТИКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ INT (2-(4-ИОДФЕНИЛ)-3(4-НИТРОФЕНИЛ)-5-ФЕНИЛТЕТРАЗОЛИЯ ХЛОРИД) БАКТЕРИЯМИ

Македошин А.С., Гурский Н.В., Калинина А.А., Соколова Т.Н., Радостин С.Ю., Смирнов В.Ф., Карташов В.Р.

ФГБОУ ВО Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, г. Нижний Новгород, Россия
603950, г. Н.Новгород, ул. Минина, 24, ГСП-41
e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

Получено кинетическое уравнение восстановления INT бактериальными клетками, которое описывает его главные особенности.

Ключевые слова: бактерии, INT, кинетика восстановления

Соли тетразолия, в частности INT, широко используются для определения активности электронного транспорта и жизнеспособности аэробных и анаэробных бактерий в чистой культуре и окружающей среде [1]. Указанные параметры физиологического состояния клетки определяются колориметрически по количеству восстановленного INT до моноформазана дегидрогеназами электроннотранспортной цепи микроорганизмов. Нами исследовалась кинетика восстановления как по убыли INT, так и по накоплению формазана. Опыты проводились в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl) с бактериями Escherichia coli, Bacillus subtillis.

Установлено, что скорость восстановления INT до формазана описывается кинетическим уравнением, порядок которого в зависимости от условий проведения процесса изменяется от 0 до 1, при этом скорость, определяемая графическим дифференцированием кинетической кривой, не подчиняется уравнению Аррениуса. На основании кинетических данных, в совокупности с литературными, сделано предположение, что лимитирующей стадией является транспорт солей тетразолия к сайтам восстановления, за которой следует быстрая стадия внутриклеточного восстановления солей тетразолия.

Используя уравнение непрерывности [2] и считая, что накопление формазана проходит в условиях квазистационарности, получено кинетическое уравнение, которое описывает главные особенности восстановления INT.

Полученные данные дают возможность более обоснованного выбора условий для определения дыхательной активности методом тетразолиевого восстановления.

Литература:
1. Seidler E.E. The Tetrazolium-Formazan system: Design and Histochemistry / E. Seidler – ISBN 3-437-11366-6. New York: G.Fischer. Stuttgart. 1991. 79 p
2. Рубин А.Б. Биофизика клеточных процессов — М.: Высш. школа, 1987УДК 620.193.8

.....

UDC 620.193.8

KINETIC OF REDUCTION INT (2-(4-IODOPHENYL)-3-(4-NITROPHENYL)-5-PHENYL-2H-TETRAZOLIUM CHLORIDE) IN BACTERIAS

Makedoshin A.S., Gurskii N.V., Kalinina A.A., Sokolova T.N., Radostin S.Iu., Smirnov V.F., Kartashov V.R.

Nizhny Novgorod State Technical University n.a. R.E. Alekseev (NNSTU), Nizhny Novgorod, Russian Federation
603950, Minin St., 24, Nizhny Novgorod
e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

A kinetic equation recovery INT bacterial cells, which describes its main features.

Key words: bacteria, INT, kinetic of reduction

The tetrazolium salt, such as the INT, widely used for evaluating of the activity of the electron transport system (ETS) and vability (fraction of active respiring bacterials) of aerobic and anaerobic bacterias in pure cultures

and environment [1]. These parameters of the physiological state of cells are determined colorimetrically by the number of monoformazan, wich is the product of the reduction INT by dehydrogenase enzymes presents in the electron transport systems microorganism. We investigated the kinetics of reduction both in loss INT, and by the accumulation of formazan. The experiments were performed in sterile saline solution (0,9% NaCl) with bacterial cultures Escherichia coli, Bacillus subtillis.

It is found that the rate of reduction of INT to INT-formazan is described by the kinetic equation wich order dependis on the conditions of the process and varies from 0 to 1. At the same thime the rate, determined by graphical differentiation of the kinetic curve, does not obey the Arrhenius equation. It suggested that the rate-limiting step is the transport of tetrazolium salts the sites of reduction, followed by a quick recovery of the intracellular stage of tetrazolium salts is based on kinetic data, in conjunction with the literature.

A kinetic equation that describes the key features of INT reduction is defend using the continuity equation [2], and considering that the accumulation of formazan is held under stady-state. The data enable make a choice to detect conditions for determination of the respiratory activity by tetrazolium reduction.

References:
1. Seidler E.E. The Tetrazolium-Formazan system: Design and Histochemistry / E. Seidler – ISBN 3-437-11366-6. New York: G.Fischer. Stuttgart. 1991. 79 p
2. Рубин А.Б. Биофизика клеточных процессов — М.: Высш. школа, 1987

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLUCATIONS

УДК 663.252.41

ВЫВЕДЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИНА ИЗ БАШКИРСКИХ СОРТОВ ВИНОГРАДА

Калужина О.Ю.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет», г.Уфа, 450001 Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. 50-летия Октября,34
e-mail: olesja_79@rambler.ru

Изучена возможность получения вина из башкирских сортов винограда – Изабелла и Александр, путем спонтанного сбраживания с дальнейшим выведением чистых культур дрожжей.

Ключевые слова: вино, дрожжи, брожение, чистая культура

Вино в Башкирии в основном получают путем спонтанного сбраживания виноградного сусла природными дрожжами. Количественный и качественный состав микроорганизмов обитающих на винограде обладает высоким биотехнологическим потенциаломПоэтому целесообразно выделение чистой культуры дрожжей (ЧКД) для местных сортов винограда, так как под воздействием природы происходит процесс их непрерывного культивирования. Так как в республике Башкортостан сбор винограда чаще всего производится в холодную дождливую погоду и ягоды подвергаются загниванию то применение ЧКД является необходимым [1].

В качестве объекта для исследования, нами были выбраны два сорта винограда – Изабелла и Александр.

«Александр» относится к группе розовых столовых сортов универсального назначения. Дегустационная оценка – 8 баллов по десятибалльной шкале. Сахаристость у этого сорта 17 %. Это ранний сорт, с высокой устойчивостью к различным заболеваниям и вредителям, в том числе осам. Вегетационный период у растения составляет от 128 до 164 дней.

Сорт «Изабелла» хорошо зимует без какого-либо укрытия.Вес большинства ягод в вызревшей кисти – 2–2, 5 г. Сахаристость в пределах 16–18%, показатель кислотности – 7–8 г/л. Дегустационная оценка 8,5 баллов. Изабелла - это сорт винограда, пригодный для потребления в свежем виде, но чаще используемый как сырье для получения соков, легких столовых вин.

При изучении механического состава гроздьев было установлено, что сорт Изабелла имеет выход

сока – 64%, Александр – 69%. Количество гребней в Изабелла – 7%, Александр – 12%.Год урожая обоих сортов – 2016.

Органолептическая оценка показала типичность сортам. Виноматериал из сорта Изабелла имел темно-рубиновую окраску, интенсивный аромат и гармоничный вкус. Средняя дегустационная оценка – 7,6 балла. Виноматериал из сорта Александр имел карамельную окраску. Хорошо выраженный сортовой аромат, плотный гармоничный вкус. Дегустационная оценка 7,2 балла.

Таким образом, как показали исследования, сорта Изабелла и Александр являются перспективными при производстве высококачественных столовых белых и красных вин.

В процессе брожения из бродящей среды выделена чистая культура непрямым методом Р.Коха на плотные среды с дальнейшим пересевом на скощенный сусло агар.

Принцип заключается в получении чистой культуры из изолированной колонии. На поверхность сусла-агара в чашке Петри распределяли каплю дрожжевой суспензии, взятой из культуральной среды. Рассеивание производили бактериологической петлей методом истощающего штриха. Затем чашки помещали в термостат крышками вниз и выдерживали при температуре 37 0С в течении 7 суток [2].

По окончании инкубации выбрали 3-5 наиболее крупных колонии и с целью сохранения культуры делали пересев петлей на поверхность скошенного сусла-агара в пробирки методом истощающего штриха. Пробирки с культурой помещали в термостат и выдерживали при температуре 37 0С на 7 суток.

Пробирки с чистой культурой (музейной) поместили на хранение в холодильник, для последующего изучения сохранности свойств.

Литература:
1. *Бодрова О.Ю. Активирующий эффект воздействия дрожжевого экстракта Saccharomyces cerevisiae// Производство спирта и ликероводочных изделий.-2006.-№4.-С 14-15*
2. *Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств Практическое руководство: Учебное пособие.- Спб.:Издательство «Лань», 2012.-224с.*

.....

UDC 663.252.41

RAISING OF PURE CULTURE YEAST FOR PRODUCING VINE FROM BASHKIR GRAPE VARIETIES

Kaluzhina O.Y.

Bashkir State Agricultural University. Ufa. Russia
e-mail: olesja_79@rambler.ru

Annotation: the opportunity of producing wine from the two Bashkir grape varieties – Isabella and Alexander, has been investigated. By means of spontaneous fermentation with further obtainment of pure culture yeast.

Key words: wine,yeast,fermentation,culture

Wine in Bashkiria is mainly produced by spontaneous fermentation of grape must with natural yeast. The Quantitative and qualitative composition of microorganisms that there are on the grape has got high biotechnological potential. Therefore, it is efficient to raise of pure culture yeast (PCY) for local grape varieties, because there is a process of their continuous cultivation under the influence of the nature. Since the vintage is very often made in a cold rainy weather in the Republic of Bashkortostan and berries are decayingthat`s why the usage of PCY is essential.

We have selected two varieties of grapes - Isabella and Alexander, as an object of research,

«Alexander» refers to a group of pink table varieties of all purpose. Tasting score - 8 points on a scale. Sugar content of this grade is 17%. This is an early variety with high resistance to various diseases and pests, including wasps. The growing season of the plant is from 128 to 164 days.

Grade «Isabella» is frost-resistant, there is no need in shelter. Weight of the most ripe berries in the brush is 2-2, 5 g. Sugar content is about 16-18%, the acid value is 7-8 g / L. Tasting score is 8.5 points. Isabella –is a grape variety, a ready to eat grape, but it is more often used as a wine material for juices, low alcohol table wines.

The study of the mechanical composition of grapes has proved that Isabella variety has got 64% of juice yield, Alexander - 69%. The number of ridges in Isabella is 7%, Alexander - 12%. The vintage of both varieties is 2016.

Detection by smelling has showed a typical nature to varieties, the wine material from Isabella variety had a dark ruby colour, an intense aroma and a seamless taste. An average tasting score is 7.6 points. The wine material from

Alexander variety had a caramel colouring, well marked varietal aroma, a dense seamless taste. Tasting score is 7.2 points.

Thus, studies have shown that Isabella and Alexander varieties are having prospects in the production of high quality table red and white wines.

During fermentation from the fermenting medium the pure culture was raised by R.Koha indirect method on solid media with further passages on reduced wort agar.

The principle is to obtain a pure culture from the isolated colonies. The drop of yeast suspension was distributed on a wort agar surface in a Petrie dish, that drop wastaken from the culture medium. The dispersion was performed by a bacteriological loop method of the debilitating stroke. The plates were then placed in an incubator lids down and kept at the temperature of 37 C for 7 days.

3-5 of the largest colonies were chosen after the incubation, to preserve the culture reseeding loops were made on the surface of the reduced wort-agar in the tubes by debilitating stroke. Culture tubes were put in a thermostat and kept at 37 C for 7 days.

Test tubes with a pure culture were placed in the refrigerator for later study of the safety features.

References:
1. *Bodrova O. Y. the Activating effect of yeast extract of Saccharomyces cerevisiae// Production of alcohol and alcoholic beverages.-2006.-№4.-14-15*
2. *Kachmazov G. S. Yeast fermentation industries a Practical guide: a Training manual.- SPb.:Publishing House «LAN», 2012.-224c.*

УДК 66-936.35+67.08:665.127.6

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ТРАНСЭТЕРИФИКАЦИИ МАСЛОЖИРОВЫХ ОТХОДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПАЗЫ EVERSA TRANSFORM КОМПАНИИ NOVOZYME

Пушкарев М.А., Мосякин Н.А., Ягмуров Э.Р., Козлов Г. В., Гарабаджиу А. В.

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия
190013, Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26
e-mail: kozlov_gv@mail.ru

Получены зависимости плотности и вязкости компонентов реакционной смеси для процесса трансэтерификации липидных отходов со спиртами сивушных масел, катализируемого липазой Eversa Transform компании NOVOZYME.

Ключевые слова: термостабильная липаза, отработанное жарочное масло, сивушное масло, трансэтерификация, биодизель.

Получение биодизельного топлива из пищевых масел оказывает серьезное давление на продовольственный рынок. Для замены пищевого сырья используют различные источники липидов, в том числе липидные отходы. Переработка отходов классическим гомогенным щелочным катализом требует предварительной очистки масел, а в случае отходов зачастую невозможна из – за низкого качества сырья. Биокатализ позволяет снизить требования к сырью, но требует больших затрат. Выпуск компанией NOVOZYME липазы Eversa Transform позволяет разрабатывать технологические процессы переработки масложировых отходов в биодизель, которые были бы перспективны с коммерческой точки зрения. Нами был исследован технологический процесс трансэтерификации различных липидных отходов со спиртами сивушного масла (рисунок 1). Область технологически значимых температур (рисунок 2) определяется зависимостью активности биокатализатора от температуры. Полученны зависимости ключевых технологических параметров компонент реакционной смеси от температуры в технологически значимом диапазоне приведены на рисунках 3-6.

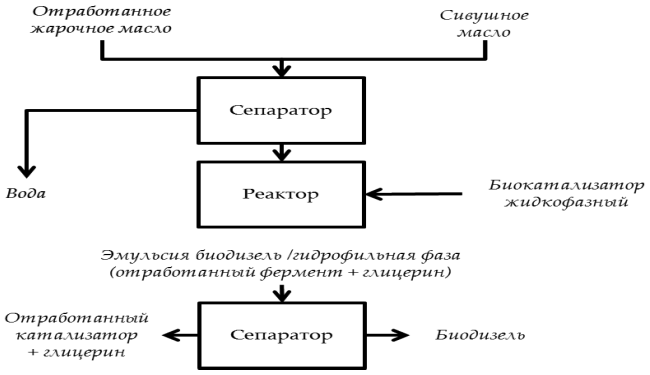


Рисунок 1 *- Технологическая блок-схема биокаталитической переэтерификации липидсодержащих отходов со спиртами сивушных масел*

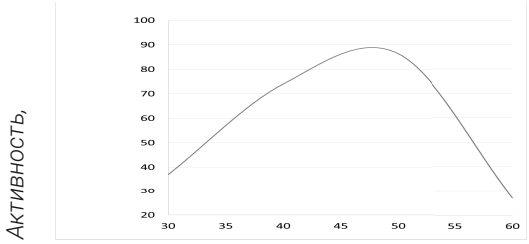


Рисунок 2 *- Зависимость активности липазы Eversa Transform от температуры (технологически значимый диапазон температур)*

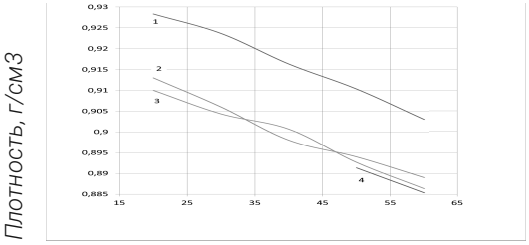


Рисунок 2 – Зависимость плотности компонентов реакционной смеси от температуры (1 – отработанное жарочное масло; 2 – биодизельное топливо; 3 – низкокачественный рыбий жир; 4 – смесь отходов животных и растительных жиров)

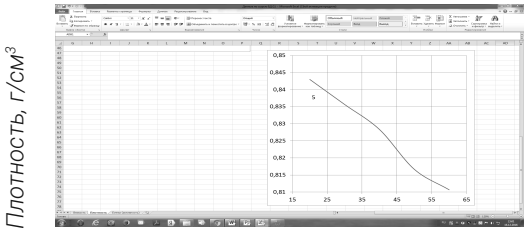


Рисунок 3 – Зависимость плотности компонентов реакционной смеси от температуры (5 - сивушное масло)

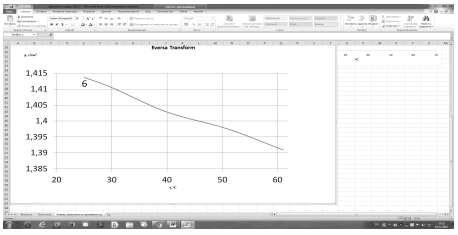


Рисунок 4 - Зависимость плотности компонентов реакционной смеси от температуры (6 - липаза Eversa Transform)

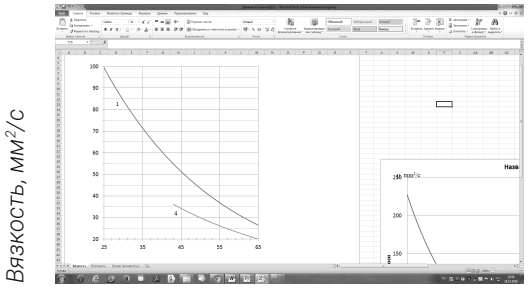


Рисунок 5 – Зависимость вязкости компонентов реакционной смеси от температуры (1 – отработанное жарочное масло; 4 – смесь отходов животных и растительных жиров)

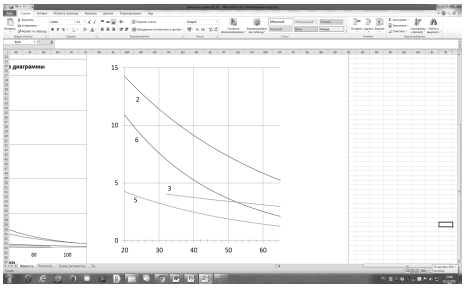


Рисунок 6 – Зависимость вязкости компонентов реакционной смеси от температуры (2 – биодизельное топливо; 3 – низкокачественный рыбий жир; 5 - сивушное масло; 6 – липаза Eversa Transform)

UDC 66-936.35+67.08:665.127.6

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF BIOCATALYTIC TRANSESTERIFICATION OF LIPID-CONTAINING WASTES BY USING LIPASE EVERSA TRANSFORM, NOVOZYME.

Pushkarev M. A., Mosyakin N. A., Yagmurov E. R., Kozlov G. V., Garabadzhiu A. V.

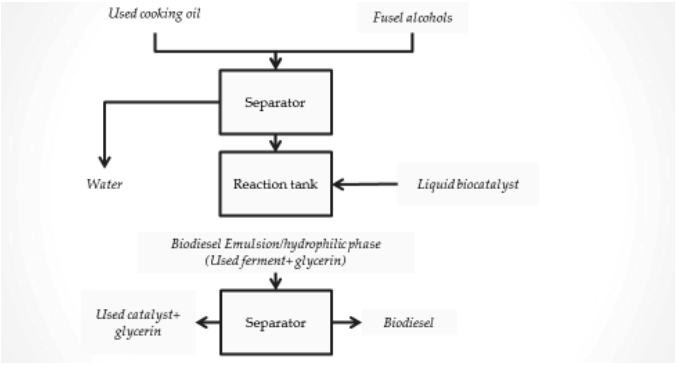
Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Russia
190013, St. Petersburg, Moscovskiy ave., 26
e-mail: kozlov_gv@mail.ru

The diagrams of viscosity and density vs temperature of the reaction mixture components from transesterification of lipid-containing wastes catalyzed by commercially available lipase Eversa Transfrom, Novozyme have been obtained.

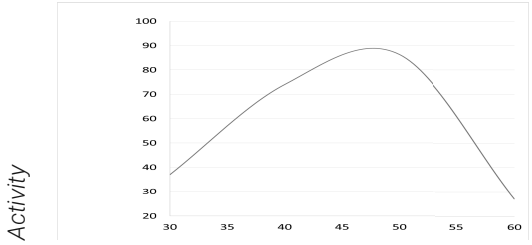
Key words: thermostable lipases, biocatalytic transesterification of triacylglycerides,, biodiesel, used cooking oil.

The biodiesel production from cooking oils is bringing a lot of pressure on the food markets. In order to overcome this obstacle and substitute the food materials a lot of different lipid sources are being explored, including lipid-containing wastes. The processing of wastes by classical homogenious alcali catalysis requires prior oil purification, however in the case of lipid wastes the process cannot take place. Biocatalysis allows to lower requirements for the raw sources, but at the same time it is more costly.

The commercially available lipase Eversa Transform produced by Novozyme allows to develop a technological process for converting oil and fat wastes into biodiesel, which is cosidered to be very economically atractive. We have investigated the technological process of biocatalytic transesterification of different lipid wastes with fusel alcohols (picture 1). The range of technologically important temperatures (picture 2) is defined by the effect of temperature on biocatalyst activity. The relations between the key technological parameters of reaction mixture components and temperature in the technologically important range have been investigated, and are illustrated on pictures 3 – 6.

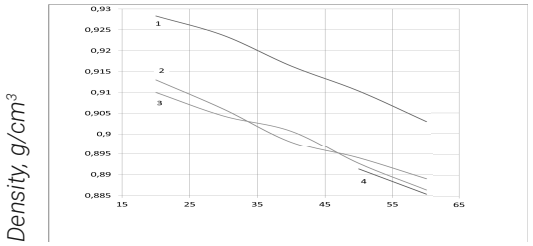


Picture 1 – Technological block-diagram of biocatalytic transesterification reaction of cooking oils with the fusel alcohols.



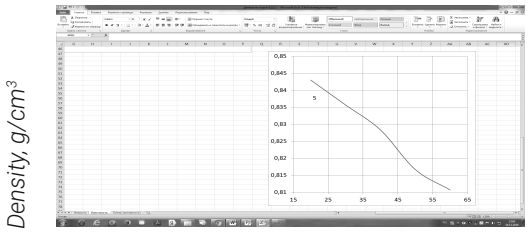
Temperature, ^0C

Picture 2 – The effect of temperature (°C) on lipase activity (technologically important temperature range)

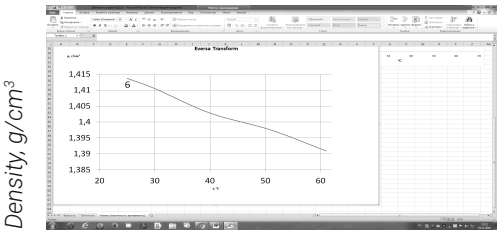


Temperature, ^0C

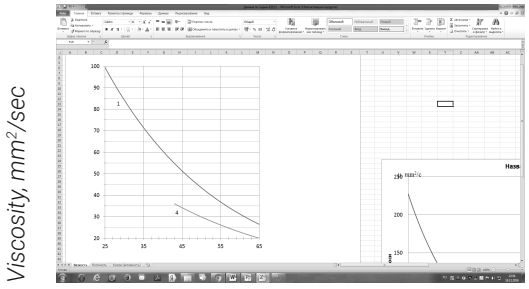
Picture 2 – Temperature effect (°C) of reaction mixture components on their density (g/cm^3) (1 – used cooking oil; 2 – biodiesel; 3 – low quality fish oil; 4 – mixture of animal and plant fats)



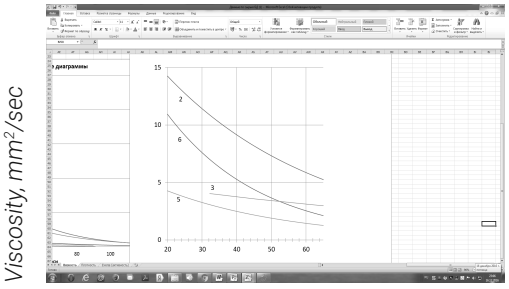
Picture 3 – The effect of temperature (^{0}C) on the density (g/cm^3) of reaction mixture components (5 – fusel alcohols)



Picture 4 – The effect of temperature (^{0}C) on the density (g/cm^3)of reaction mixture components (6 – Eversa Transform Lipase)



Picture 5 – The effect of temperature (^{0}C) on the viscosity (mm2/sec) of reaction mixture components (1 – used cooking oil; 4 – mixture of animal and plant fats)



Picture 6 – The effect of temperature (^{0}C) on the viscosity (mm^2/sec) of reaction mixture components (2 – biodiesel; 3 – low quality fish oil; 5 – fusel alcohols; 6 – Eversa Transform Lipase)

УДК 577.112.083+67.08:665.127.6

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ ИЗ BACILLUS LICHENIFORMIS, ИЗОЛИРОВАННОЙ ИЗ КОММУНАЛЬНОГО КОМПОСТА

Пушкарев М.А.[1], Ягмуров Э.Р.[1], Мосякин Н. А.,[1] Зуева Е.В.[2], Козлов Г. В.[1]., Гарабаджиу А. В.[1]

[1]Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия
190013, Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26
e-mail: kozlov_gv@mail.ru
[2]ФБУН НИИ Эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Россия
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14

Из горячего компоста из твердых коммунальных отходов (ТКО) изолирована, бактерия, обладающая высокой липолитической активностью идентифицированная как Bacillus licheniformis. Из неё выделена, очищена и охарактеризована термостабильная липаза, использованная для получения эфиров жирных кислот из липидсодержащих отходов.

Ключевые слова: термофильные бактерии, Bacillus licheniformis, термостабильные липазы, биокаталитическая трансэтерификация триглицеридов, компост из ТКО.

Компост из твердых коммунальных отходов является экстремальной техногенной экологической нишей. Содержание в составе ТКО пищевых отходов, включающих жиры белки и углеводы, а также температура компостирования 50-60 °С делает компост перспективным резервуаром продуцентов термостабильных гидролаз.

Нами было изолировано 29 культур термофильных (+50 °С) бактерий из компоста, предоставленного опытным заводом МПБО (пос. Горелово, Ленинградская обл.), проведен их скрининг на селективных

средах с использованием кальциевых солей и родамина В. 15 культур, показавших наибольшую активность были идентифицированы с помощью классических микробиологических методов и MALDI TOF масс-спектрометрии (Mikroflex Biotyper System Bruker, Германия) среди них было выявлено 3 различных вида: Brevibacillus borstelensis, Bacillus licheniformis, Bacillus thermoamylovorans. Данные культуры были отобраны для глубинного культивирования и скрининга фотоколориметрическим методом с использованием п-нитрофенилпальмитата как субстрата. Самой активной культурой оказалась культура вида Bacillus licheniformis, которая была описана Kaur и др., как продуцента липаз. Фермент выделяли из Bacillus licheniformis методом высаливания, в дальнейшем, фракции, обладающие липолитической активностью очищали с помощью гель-фильтрации на Сефадекс G-100. Удельная активность препарата в пересчете на белок составила 14,46 U мг-1.

Проведена трансэтерификация отходов пищевых производств – животного жира и отработанного жарочного масла со спиртами сивушных масел, катализируемая полученной липазой. Показано, что выделенная нами липаза более активна в отношении отработанного жарочного масла, чем ферментативный препарат, выпускаемый компанией Novozymes, а в отношении животного жира уступала этому препарату.

Литература:
1. Kaur G., Singh A., Sharma R., Sharma V., Verma S., Sharma P. K. Cloning, expression, purification and characterization of lipase from Bacillus licheniformis, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India//3 Biotech. 2016. Vol. 6. № 1. P. 49

UDC 577.112.083+67.08:665.127.6

EXPRESSION, PURIFICATION AND APPLICATION IN BIODIESEL PRODUCTION OF THERMOSTABLE BACILLUS LICHENIFORMIS LIPASE ISOLATED FROM THE COMPOST OF MUNICIPAL SOLID WASTES (MSW)

Pushkarev M. A.,[1] Yagmurov E. R.,[1] Mosyakin N. A.,[1] Zuyeva E. V.,[2] Kozlov G. V.,[1] Garabadzhiu A. V.[1]

[1]Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Russia
190013, St. Petersburg, Moscovskiy ave., 26
e-mail: kozlov_gv@mail.ru
[2]Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia
197101, St. Petersburg, ul. Mira, 14.
e-mail: elenazueva9@gmail.com

The thermostable lipase-producing bacterium culture with the high lipolytic activity was isolated from the hot compost of municipal solid wastes (MSW). The culture was identified as Bacillus licheniformis and the lipase was obatined, purified and applied for the production of fatty acids esters from lipid-containing wastes.

Key words: thermophilic bacteria, Bacillus licheniformis, thermostable lipases, biocatalytic transesterification of triacylglycerides, composts from MSW.

The compost from municipal solid wastes (MSW) is considered to be an extreme anthropogenic ecological niche. The presence of high temperature of 50 – 60 °C as well as food wastes in MSW, including fats, proteins, and carbohydrates make the compost a promising source of thermostable producers of hydrolases.

We have isolated 29 thermophilic (50 °C) bacterial cultures from the compost that was obtained from the experimental plant “Mechanized Processing of Municipal Wastes” which is located in Gorelovo, Leningrad region. The cultures were screened on selective agar plates with Rhodamine B and Tween 80. 15 cultures that showed the highest lipase activity were identified by classical microbiological methods and MALDI-TOF mass-spectrometry (Mikroflex BioTyper System Bruker, Germany). Among these cultures three bacterial species strains were identified as Bacillus licheniformis, Brevibacillus borstelensis, and Bacillus thermoamylovorans. With further analysis, the reported cultures were subjected to submerged cultivation and assayed for specific lipase activity by photocolorimetry method with 4-Nitrophenyl palmitate as a substrate. The culture with highest lipase activity was reported as Bacillus licheniformis, which was also described by Kaur et al. as a lipase producer, hence this culture was selected as the prominent source of extracellular lipase. The enzyme was first purified and concentrated by ammonium sulfate perception, fractions with the lipase activity were dialyzed and applied to the Sephadex G-100 gel filtration column after which the specific lipase activity of purified enzyme was reported as 14.46 U mg-1.

The purified protein was used in catalyzed transesterification reaction of animal fats and used cooking oils with the fusel alcohols. The results have indicated that the newly synthesized lipase had a higher activity towards the used cooking oils comparing to the commercially available enzyme product made by Novozymes, as for the animal fats the lipase had shown lesser activity.

References:
Kaur G., Singh A., Sharma R., Sharma V., Verma S., Sharma P.K., Cloning, expression, purification and characterization of lipase from Bacillus licheniformis, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India//3 Biotech. 2016. Vol. 6. № 1. P. 49

УДК 544.77.032.16:664

ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН

Ивлева А.Р.[1], Хайруллина З.А.[1], Гематдинова В.М.[1], Хузин Ф.К.[1], Сметанская И.Н.[2], Канарский А.В.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»).
[2]Университет прикладных наук Wiehenstephan-Triesdorf.
Казань, Россия ,420015, ул. Л. Толстого, д.8
e-mail: zuzik1@inbox.ru

Показана целесообразность использования ферментов при получении растворимых и нерастворимых пищевых волокон.

Ключевые слова: полисахариды, растворимые и нерастворимые пищевые волокна, инулин, бета глюкан.

Пищевые волокна относятся к незаменимым факторам питания. Установлено, что одной из причин увеличения числа лиц, страдающих атеросклерозом, гипертонией, диабетом и раком толстой кишки, является недостаточной содержание в рационе пищевых волокон. Поэтому в настоящее время актуальным является использование диетических пищевых волокон в производстве продуктов питания. В частности, к таким пищевым волокнам относятся растворимые – фруктаны (инулин и олигофруктоза), бета глюкан и нерастворимые (лигнин, целлюлоза, гемицеллюлозы). Применение пищевых волокон актуально для получения продуктов функционального назначения. При получении нерастворимых и растворимых пищевых волокон из растительного сырья используют химические методы, которые приводят к существенному изменению их физико-химических свойств и, соответственно, снижению их функциональных свойств.

Цель настоящей работы – изучение возможности использования биотехнологических методов при получении растворимых и нерастворимых пищевых волокон из растительного сырья.

Исследована возможность выделения бета-глюкана кислотным, щелочным и ферментативным способами из овса. Выход бета глюкана при выделении кислотным методом составил 64 %, при выделении щелочным методом 60 %, ферментативный метод позволяет выделить из овса 80 % бета глюкана. Полученные результаты исследований подтверждают целесообразность выделения бета -глюкана из овса ферментативным методом. Следует отметить, что ферментативный метод по сравнению со щелочным и кислотным методами выделения бета глюкана экологически безопасен.

Установлено влияние химического и ферментативного способа обработки нерастворимых пищевых волокон на адсорбцию по отношению к воде и жиру. Показано, что влияние способа обработки на адсорбционные свойства нерастворимых пищевых волокон взаимосвязано со свойствами исходного растительного сырья и присутствующих в них ингредиентов (лигнина, гемицеллюлозы, минеральных веществ, смол и т.п.). Применение ферментов позволяет извлекать из клетчатки гемицеллюлозу и лигнин и тем самым увеличивать адсорбцию масел. При этом ферментативные методы удаления из клетчатки лигнина, смол, минеральных веществ повышает адсорбционные свойства клетчатки по отношению к воде.

Разработана технология получения сгущенного экстракта цикория при низких температурах. Экстракты содержат не разрушенные фруктаны – важные растворимые пищевые волокна, которые оказывают положительное влияние на рост Bifidobacterium Bifidum. Показано, что термическая обработка цикория приводит к разрушению фруктанов и в жареных продуктах цикория, таких как растворимый цикорий фруктаны отсутствуют. Термически обработанные продукты из цикория оказывали негативное влияние на накопление биомассы Bifidobacterium Bifidum.

UDC 544.77.032.16:664

THE APPLICATION OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR OBTAINING OF DIETARY FIBER

Ivleva, A.R.[1], Khairullina, Z.A.[1], Gimatdinova V.M.[1], Khuzin F.K.[1], Smetanska I.N.[2],Kanarsky A.B.[1]

[1]Federal State Educational Institution of Higher Professional Education «Kazan State Technological University» (VPO «KNRTU»).
[2]University of applied Sciences Wiehenstephan-Triesdorf.
Kazan, Russia, 420015, st. Tolstoy, 8
e-mail: zuzik1@inbox.ru

The expediency of use of enzymes used to obtain soluble and insoluble dietary fiber.

Key words: polysaccharides, soluble and insoluble dietary fiber, inulin, beta glucan.

Dietary fibers are essential nutritional factors. It is established that one of the reasons for the increase in the number of persons suffering from atherosclerosis, hypertension, diabetes and colon cancer, insufficient intake of dietary fiber. Therefore, at the present time is the actual use of dietary fibers in food production. In particular, these dietary fibers are soluble – fructans (inulin and oligofructose), beta glucan and insoluble (lignin, cellulose, hemicellulose). The use of dietary fiber is important for obtaining functional foods. Upon receipt of insoluble and soluble dietary fiber from vegetable raw materials using chemical methods, which lead to a significant change in their phisico-chemical properties and, consequently, a decrease in their functional properties.

The aim of this work was to study the possibility of using biotechnological methods in obtaining soluble and insoluble dietary fiber from vegetable raw materials.

Investigated the possibility of separating beta-glucan acid, alkaline and enzymatic methods from oats. The beta glucan in the acid allocation method was 64 %, the allocation of the alkaline method is 60 %, the enzymatic method allows you to select from oats 80% of beta glucan. The results obtained confirm the feasibility of allocation of beta -glucan by enzymatic method. It should be noted that the enzymatic method compared to the alkaline and acid methods of detection of beta glucan is environmentally safe.

The influence of chemical and enzymatic processing method of the insoluble dietary fiber on adsorption in relation to water and fat. It is shown that the influence of the method of treatment on adsorption properties of insoluble dietary fibers interrelated with the properties of the original plant material and present in the ingredients (lignin, hemicellulose, mineral substances, resins, etc.). The application of enzymes allows you to extract cellulose from the hemicellulose and lignin, and thereby increase the adsorption of oils. While enzymatic methods of removing cellulose from lignin, resins, mineral substances increases the adsorption properties of the fiber relative to the water.

The technology of production of condensed extract of chicory at low temperatures. Extracts contain not destroyed fructans is an important soluble dietary fiber that have a positive impact on the growth of Bifidobacterium Bifidum. It is shown, that heat treatment of chicory leads to the destruction of fructans and roasted chicory products like soluble chicory fructans do not exist. Thermally processed products from chicory had a negative impact on the accumulation of biomass Bifidobacterium Bifidum.

.....

УДК 577.152.31

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ UREIBACILLUS THERMOSPHAERICUS, УСТОЙЧИВОЙ К ОРГАНИЧЕСКИМ РАСТВОРИТЕЛЯМ

Самойлова Ю.В.[1], Сорокина К.Н.[1,2], Пармон В.Н.[1,2]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д.5
e-mail: samoylova.jv@catalysis.ru

В данной работе была получена и охарактеризована термостабильная эстераза бактерии U. thermosphaericus, экспрессированная в E. coli BL21 (DE3). Изучены свойства эстеразы в отношении широкого диапазона значений температур и различных органических растворителей.

Ключевые слова: эстераза, термостабильность, метанол, биодизельное топливо.

Термостабильные эстеразы нашли широкое применение в современных технологических процессах, в том числе в химической промышленности, для получения биодизельного топлива и т.д. Ключевыми показателями, определяющими эффективность использования эстераз в промышленности, являются термостабильность и устойчивость по отношению к органическим растворителям, т.к. часто реакции протекают при высоких температурах (40-70°C) или в присутствии растворителей (например, метанола).

Эстераза термофильной бактерии U. thermosphaericus была экспрессирована в клетках E. coli BL21 (DE3) на основе вектора pET32b. Исследование свойств эстеразы выявило ее высокую термостабильность. Она сохраняла около 80 % от первоначальной активности после инкубации в течение 1 ч в диапазоне температур 40-90 °C и свыше 73 % - после 4 ч при температурах 50-70 °C. Также исследуемый фермент показал высокую стабильность в присутствии ряда органических растворителей, а именно н-гексана, ацетона, DMF, ацетонитрила и одноатомных спиртов – при инкубации в течение 1 ч при температуре 50 °C в данных растворителях эстераза сохраняла 100 % от первоначальной активности. Таким образом, полученные результаты говорят о перспективности применения термостабильной, устойчивой к влиянию растворителей, эстеразы estUT1 в составе биокатализаторов различных технологических процессов, например, реакции переэтерификации для получения биодизельного топлива.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-38-00425 мол_а.

УДК 577.152.31

PROPERTIES OF THERMOSTABLE AND ORGANIC SOLVENT TOLERANT ESTERASE FROM UREIBACILLUS THERMOSPHAERICUS

Samoylova Y.V.[1], Sorokina K.N.[1,2], Parmon V.N.[1,2]

[1] Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
e-mail: samoylova.jv@catalysis.ru

In this study, a thermostable esterase from U. thermosphaericus expressed in E. coli BL21 (DE3) was obtained and characterized. Its thermostability and resistance to various organic solvents were studied.

Key words: esterase, thermostability, methanol, biodiesel.

Thermostable esterases are widely used in modern industry, including chemical industry, biodiesel production, etc. The major factors that determine efficiency of their application in the industry are thermostability and resistance to organic solvents, as these reactions often take place at high temperatures (40-70 °C) or in the presence of solvents (for example, methanol).

The esterase from thermophilic bacteria U. thermosphaericus was expressed in E. coli BL21 (DE3) cells, using pET32b as expression vector and showed high thermostability. It retained about 80 % residual activity after incubation for 1 h at the temperature 40-90 °C and over 73 % of residual activity for 4 h at 50-70 °C. It also demonstrated high stability in the presence of organic solvents, namely, n-hexane, acetone, DMF, acetonitrile and monohydric alcohols – it retained 100 % enzyme activity after incubation for 1 h at 50 °C. Thus, these results show prospects of application of thermostable and organic solvent tolerant esterase from U. thermosphaericus in various technologies, for example, in the reaction of transesterification to produce of biodiesel.

This work was supported by RFBR grant № 16-38-00425 mol_a.

УДК 544.473:577.15

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЛИЗИНЫ СТАФИЛОКОККОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ – ВЗАИМОСВЯЗЬ СТУРУКТУРА-СТАБИЛЬНОСТЬ И ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЗИМОВ

Филатова Л. Ю., Клячко Н. Л.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 119991, Ленинские горы, 1-11
e-mail: luboff.filatova@gmail.com

Выявлены оптимальные условия проявления активности и сохранения стабильности лизинов фагов K, phi11, phi80α, 8161, 2638a. Установлены взаимосвязи между вторичной и третичной структурой лизинов и их активностью/стабильностью. Произведено включение ферментов в нетоксичные и биоразлагаемые наноматрицы для понижения иммунотоксичности.

Ключевые слова: Staphylococcus aureus, фаговый лизин, стабильность, структура, нанозим.

Staphylococcus aureus (золотистый стафилококк) - микроорганизм, который вызывает кожные, раневые, респираторные и кишечные заболевания организмов человека и животных. 90% штаммов S. aureus устойчиво к одному антибиотику или обладают множественной лекарственной устойчивостью. В связи с этим существует необходимость поиска новых способов лечения стафилококковых инфекций. Лизины бактериофагов могут выступать в качестве агентов для лечения инфекционных заболеваний, вызываемых S. aureus. Лизины образуются на первой и последней стадиях литического цикла бактериофага в клетке патогена, в настоящее время их выделяют в рекомбинантной форме. Они разрушают клетки S. aureus за счет гидролиза химических связей в пептидогликане, основном компоненте клеточных стенок грамположительных бактерий. Всестороннее исследование лизинов стафилококковых фагов важно с научной и практической точек зрения, так как помогает лучше адаптировать эти биокатализаторы для использования в медицинских целях.

Активность и стабильность – важные параметры, определяющие использование ферментов на практике. Для лизинов фагов K, phi11, phi80α, 8161, 2638a исследована стабильность в зависимости от состава среды (pH, присутствие солей, сыворотка и плазма крови), температуры (4°C - 50°C), концентрации фермента (0.2 – 2 мг/мл). Подобраны условия, в которых ферменты могут сохранять до 100% активности в течение 1 года инкубации при температуре хранения (4°C). Выявлены особенности изменения вторичной и третичной структур лизинов в зависимости от условий среды (или условий инактивации). Показано, что чем выше стабильность фермента, тем меньше изменяется его вторичная или третичная структура в процессе инактивации.

Лизины фагов K, phi11, phi80α, 8161, 2638a являются белками, молекулы которых иммуногенны. Для устранения этой проблемы было проведено получение нанозимов (самопроизвольно образующихся комплексов фермент-полимер). Путем подбора полимерной наноматрицы (блок-сополимеры полилизин-полиэтиленгликоль, полиглутаминовая кислота-полиэтиленгликоль) удалось получить нанозимы, содержащие лизины фагов K, phi11. Показано, что при формировании нанозимов стафилолитических ферментов с полимерами происходит структурирование молекул лизинов. Это обеспечивает высокую стабильность (сохранение 100% активности более 6 месяцев) и увеличение эффективности лизиса клеток S. aureus. При формировании наночастиц происходит взаимодействие заряженных групп молекул фермента и блок-сополимера. В результате этого происходит включение молекул лизина в заряженное ядро частиц, поверхность которых покрывает «корона» из цепочек полиэтиленгликоля. Включение в состав формируемых таким образом нанозимов снижает токсичность биокатализаторов, что обусловливает высокий потенциал применения нанозимов литических ферментов бактериофагов в медицинских целях.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-13-00731.

UDC 544.473:577.15

RECOMBINANT LYSINS OF STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGES: CORRELATION STRUCTURE-STABILITY AND INVENTION OF NANOZYMES

Filatova L.Y., Klyachko N.L.

M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, 119991, Leninskiye Gory, 1-11
e-mail: luboff.filatova@gmail.com

The stability/activity of recombinant lysins of phages K, phi11, phi80α, 8161, 2638a was investigated under the conditions of storage and functioning, and the correlation between the stability and the secondary/tertiary structure of the enzymes was found. The immunogenicity of lysins was reduced by incorporating the enzymes into biodegradable nanomatrixes.

Key words: Staphylococcus aureus, phage lysin, stability, structure, nanozyme.

Staphylococcus aureus (Gram-positive microorganism) causes a large number of dangerous diseases (wound, respiratory and intestinal infections) of humans and animals. S. aureus rapidly develops resistance to a broad spectrum of antibiotics used in clinical medicine. All the above mentioned contribute to an intensive search for new ideology of treatment of patients with staphylococcal infections. The use of bacteriophage lytic enzymes (cell wall degrading proteins that are important to both the initial and terminal stages of the phage infection and lytic cycle) as antimicrobial agents is a promising alternative to conventional antibiotic therapy. Phage endolysins reveal high efficacy in destroying antibiotic-resistant pathogens with a mg quantities able to be produced in a recombinant form. To assess the possibility of practical use it is essential to study the activity and stability of enzymes under different conditions.

Both activity and stability of enzymes is an important parameter when considering the possibility of using these active catalysts in medicine. The aim of the study was to carry out a physicochemical investigation of lysins of phages K, phi11, phi80α, 8161, 2638a. It contained the investigation of the lysins activity and stability in physiological conditions (presence of NaCl, human serum, human plasma); the study of temperature inactivation of the enzymes (4-50°C, 0.2-0.4 mg/ml enzyme, different pH values). The optimum storage conditions for lysins were found under which the enzymes retain their initial activity within a year (4°C). The loss of the enzyme activity may be associated with structural changes (secondary structure, tertiary structure). It is shown that the higher the stability of the enzyme, the less it changes the secondary or tertiary structure during the inactivation process.

The main disadvantage of lysins as candidate therapeutics is their immunogenicity. The interaction between lysin (lysins of phages K and phi11) molecules and polymers (poly-L-lysine-polyethylene glycol block-copolymers, poly-L-glutamic acid-polyethylene glycol block-copolymers) results in the formation of protein-polyelectrolyte complexes (nanozymes). Complexing with block-copolymers produces a stabilizing effect on lysins due to structure ordering. Nanozymes of lysins of phages K and phi11 with block-copolymers have demonstrated sufficient stability at the temperature of storage (4°C). Lysin molecules when reacting with block-copolymers are incorporated in the particle cores. This process occurs through the formation of electrostatic contacts between charged sites of the enzyme molecules and oppositely charged fragments of molecules of block-copolymers. Polyethylene glycol chains of the molecules of block-copolymers are probably interacting with the aqueous phase (PEG-corona). The inclusion in a polymer matrix may result in a reduced immunogenicity of lysin which is a prerequisite for use as antimicrobial agent.

The study was supported by Russian Scientific Foundation (grant number 14-13-00731).

УДК 57.033

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ЛИПИД-ПРОДУЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ НАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА

Пилигаев А.В.[1], Сорокина К.Н.[1,2], Пармон В.Н.[1,2]

[1] Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, г. Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия
Адрес для переписки: пр. академика Лаврентьева 5, Новосибирск, Россия, 630090
e-mail: piligaev@catalysis.ru

Проведено исследование характеристик роста и накопления липидов штаммами, выделенных из природных источников, при фототрофном культивировании. Выявлены штаммы с высоким содержанием липидов и насыщенных жирных кислот, перспективные для переработки в биодизельное топливо высокого качества.

Ключевые слова: микроводоросли, биотопливо, липиды, жирные кислоты.

Выделение и изучение свойств новых штаммов микроводорослей, предназначенных для получения биотоплива, является актуальной задачей биотехнологии. Одним из ключевых требований к исходному сырью для получения биотоплива высокого качества является высокое содержание насыщенных жирных кислот и низкое содержание полиненасыщенных. Целью данной работы являлся скрининг свойств штаммов микроводорослей, выделенных из природных источников, для выявления липид-продуцирующих штаммов с высоким содержанием насыщенных жирных кислот и высокой продуктивностью биомассы, пригодных для производства биотоплива высокого качества.

В работе исследовано 12 штаммов микроводорослей при фототрофном способе культивирования на среде Болда путем скрининга в 24-луночных планшетах по параметрам продуктивности биомассы и липидов. Филогенетический анализ последовательности гена 18S rRNA подтвердил принадлежность выделенных штаммов к родам Chlorella, Botryococcus, Scenedesmus, Nannochloris и Bracteacoccus. По результатам флуоресцентного анализа красителем Nile Red выбрано 5 штаммов, обладавших наибольшей продукцией липидов. Их содержание составило 33,4-44,4 % от сухого веса, а основными жирными кислотами липидов были C16:0, C18:0 и C18:1. Среди всех исследованных штаммов наибольшим содержанием насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот обладал штамм Scenedesmus abundans IC-75 (72.8% от общего содержания всех жирных кислот). При этом штамм Scenedesmus abundans IC75 обладал наибольшей специфической скоростью роста 0,20 ± 0.01 сутки–1, продуктивность биомассы составила 73,82 ± 4,53 мг·л-1·сутки-1 и максимальное содержание липидов 44,4 ± 2,7% в условиях голодания по азоту. Эти свойства, в соответствии с международными стандартами качества биодизельного топлива ANP255, EN14214 и DIN51606, характеризуют данный штамм высоким потенциалом для применения в качестве биомассы с высоким содержанием липидов и насыщенных жирных кислот в получении биотоплива высокого качества.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ИК СО РАН (проект № 0303-2016-0012).

UDC 57.033

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIPID-PRODUCING STARINS OF MICROALGAE WITH HIGH SATURATED FATTY ACID CONTENT FOR BIOFUEL PRODUCTION

Piligaev A.V.[1], Sorokina K.N.[1,2], Parmon V.N.[1,2]

[1] Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia
Correspondence address: pr. Lavrentieva 5, Novosibirsk, Russia, 630090
E-mail: piligaev@catalysis.ru

The study of growth characteristics and lipid accumulation of microalgae strains isolated from natural sources cultured under phototrophic condition was conducted. Promising lipid-producing strains with high content of saturated fatty acid for high quality biofuel production was selected.

Key words: microalgae, biofuel, lipids, fatty acid.

Isolation and characterization properties of new strains of microalgae for biofuel production is an important area of biotechnology. High level of saturated fatty acid content is a key factor for high quality biofuel production from renewable feedstock. The aim of this study is to screen microalgae strains isolated from natural sources to identify promising lipid-rich strains with a high content of saturated fatty acid and a high biomass productivity for the biofuel production.

In this study, 12 microalgal strains were screened for the biomass and lipid productivity during cultivation in the Bold's medium under phototrophic condition in 24-well plates. Phylogenetic analysis based on 18S rRNA gene revealed that the isolated strains belong to genera of Chlorella, Botryococcus, Scenedesmus, Nannochloris and Bracteacoccus. According to Nile red fluorescent analysis of lipids, five microalgae strains with the highest lipid content were selected as a promising strains. C16:0, C18:0, C18:1 fatty acids are the main component of lipids produced by these stains with the total lipid content from 33,4% to 44,4%. Among all of the studied strains, Scenedesmus abundans IC-75 had a highest total content of saturated and monounsaturated fatty acids (72.8%). And the highest specific growth rate (0.20 ± 0.01 d−1), biomass productivity (73.82 ± 4.53 mg L−1 d−1) and lipid content (44.4 ± 2.7%) in nitrogen depleted conditions was observed for strain Scenedesmus abundans IC-75. The quality of biodiesel produced form Scenedesmus abundans met the criteria of international biodiesel standards (ANP255, EN14214 and DIN51606) and made these strain prospective for use as a source of renewable biomass with a high content of lipids and saturated fatty acids for high-quality biofuel production.

This work was conducted within the framework of budget project No. 0303-2016-0012 for Boreskov Institute of Catalysis.

УДК 615.281: 577.15

ЛИЗИН A. BAUMANNII КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ АГЕНТ

Белый Т.С.[1], Мишкин Д.В.[1], Шнейдер М.М.[2], Мирошников К.А.[2], Клячко Н.Л.[1]

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия
119991, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11, кафедра химической энзимологии
e-mail: tarasbelyy@gmail.com

Клонирован ген лизина из Acinetobacter baumannii, определены оптимальные условия экспрессии и очистки фермента. Показана способность фермента катализировать лизис культуры клеток E. coli. Изучены физико-химические характеристики фермента.

Ключевые слова: антибактериальные ферменты, A. baumannii, E. coli, pH-оптимум, термостабильность.

Получена генетическая конструкция на основе вектора pBAD, содержащая ген лизина A. baumannii (Aclys) с гистидиновым тагом на N-конце под контролем арабинозного промотора. Экспрессия фермента осуществлена в арабинозо-дефектном штамме E. coli DH10B в течении 4 часов при 37ºC и массовой концентрации арабинозы 0.2%. Препарат фермента очищен с помощью Ni-аффинной хроматографии и последующей гель-фильтрацией, чистота препарата доказана с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Показана способность Aclys катализировать лизис грамотрицательных бактерий на примере штамма E. coli CR63. Активность фермента определяли турбидиметрически по уменьшению оптической плотности суспензии клеток. Выявлена высокая зависимость активности фермента от концентрации NaCl: при 30 мМ NaCl фермент теряет 90% активности. pH-оптимум действия Aclys составляет 6.0. При изучении термостабильности было выяснено, что при 50ºC фермент полностью теряет активность в течении 10 мин, при 37ºC время полуинактивации составляет 30 мин. Показана высокая стабильность Aclys при хранении в буфере pH 8.0 при 4°C: фермент сохраняет более 90% активности на протяжении трех месяцев.

UDC 615.281: 577.15

LYSIN FROM A. BAUMANNII AS A PERSPECTIVE ANTIBACTERIAL AGENT

Belyy T.S.[1], Mishkin D.V.[1], Shneider M.M.[2], Miroshnikov K.A.[2], Klyachko N.L.[1]

[1]Lomonosov Moscow State University, Chemical Enzymology Department, Moscow 119991, Russia
[2]Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia
e-mail: tarasbelyy@gmail.com

Lysin gene has been cloned from Acinetobacter baumannii, the optimal conditions for expression and purification of the enzyme have been determined. The ability of the enzyme to catalyze lysis of the cell culture E. coli has been shown. The physicochemical characteristics of the enzyme have been studied.

Key words: antibacterial enzymes, A. baumannii, E. coli, pH-optimum, thermostability.

The genetic construction containing lysin gene from A. baumannii (Aclys) with N-terminal His-tag controlled by arabinose promoter was obtained on the basis on pBAD vector. Expression of the enzyme was performed in arabinose-defective E. coli DH10B strain during 4 hours at 37ꝏC under the mass concentration of arabinose being equal to 0,2%. The enzyme sample was purified by Ni-affinity chromatography and subsequent gel filtration chromatography; the purity of the enzyme was proved by polyacrylamide gel electrophoresis.

The ability of Aclys to catalyze lysis of gram-negative bacteria was shown on E. coli CR63 strain. The enzyme activity was determined by turbidimetric decrease in optical density of cell suspension. The enzyme activity is highly dependent on NaCl concentration: the enzyme loses 90% of its activity under concentration of NaCl being equal to 30 mM. pH-optimum of enzyme activity of Aclys is equal to 6.0. It was found that the enzyme completely loses its activity during 10 min at 50ꝏC; the half-inactivation time is equal to 30 min at 37ꝏC. The high storage stability of Aclys in buffer solution at pH 8.0 and 4°C was shown: the enzyme retains 90% of its activity during three months.

УДК 579.222:579.66

ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ НИТРИЛГИДРАТАЗ

Махсумханов А.А., Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Камбаралиева М.И., Ташбаев Ш.А.

Институт микробиологии АН РУз

Выделено 102 штамма бактерий из 12 почвенных образцов. Установлено, что 41 штамм из выделенных бактерий относятся к роду Bacillus, 36 – к роду Pseudomonas, 15 – к роду Rhodococcus и 10 штаммов к роду Micrococcus. Установлено, что из протестированных штаммов по образованию фермента, наиболее активными продуцентами нитрилгидратазы являются штаммы Rhodococcus sp. – 2/1 и 2/2, выделенные из образцов почв АО «Навоийазот».

Ключевые слова: выделение, бактерия, штамм, нитрилгидратазная активность, НАК, акриламид.

Известно, что акриламид является ценным мономером в крупнотоннажном производстве полиакриламида и различных сополимеров акриловой кислоты. В настоящее время полимеры и сополимеры акриламида широко используются во многих отраслях промышленности, в различных областях техники и технологии. В ближайшем будущем энергоемкий способ химического синтеза акриламида будет заменен одностадийным экологичным биокаталитическим процессом, где применяют ферментативно-активные клетки бактерий. В связи с этим, нами был продолжен поиск потенциальных продуцентов нитрилгидратазы из 4-х почвенных образцов, полученных с территории Института микробиологии АН РУз и 8-и почвенных образцов привезенных с территории АО «Навоийазот». Образцы почв засеяли в питательную среду R и выращивали в течение двух недель, периодически добавляя 1% акрилонитрила (НАК). После этого произвели серийные разведения и засеяли их на твердую питательную среду S2M и инкубировали при температуре 28-30 оС. В результате было выделено 102 штамма бактерий, способные расти на среде S2M в присутствии 1% НАК. По морфологическим свойствам выделенные бактерии были отнесены к роду Bacillus – 41 штамм, к роду Pseudomonas– 36, к роду Rhodococcus – 15 и к роду Micrococcus– 10. Все выде-

ленные штаммы были выращены на жидких питательных средах, а их биомасса протестирована на трансформацию НАК в акриламид. В результате проведенных экспериментов было установлено, что штаммы Rhodococcus sp. – 2/1и 2/2 образуют высокоактивную нитрилгидратазу с активностью 220 и 200 Ед/мг соответственно, которые эффективно трансформируют акрилонитрил в акриламид.

UDC 579.222:579.66

ISOLATION OF BACTERIAL STRAINS – PRODUCERS OF NITRILEHYDRATASE

Makhsumkhanov A.A., Alimova B.Kh., Pulatova O.M., Kambaralieva M.I., Tashbaev Sh.A.

Institute of Microbiology

The 102 bacterial strains from 12 soil samples have been isolated. It was established that 41 strains of the isolated bacteria belong to the genus Bacillus, 36 – to the genus Pseudomonas, 15 – to the genus Rhodococcus and 10 strains to the genus Micrococcus. It was found that the most active producer strains of nitrilehydratase are Rhodococcus sp. – 2/1 and 2/2 of the tested strains by enzyme production, which were isolated from soil samples of the JSC «Navoiyazot».

Key words: isolation, bacteria, strain, nitrilehydratase activity, acrylonitrile, acrylamide.

It is known that acrylamide is valuable monomer in the bulk manufacture of polyacrylamide and various copolymers of acrylic acid. Currently, polymers and copolymers of acrylamide are widely used in many industries, in various fields of engineering and technology. In the near future energy-intensive method of chemical synthesis of acrylamide will be replaced by a single-stage environmentally friendly biocatalytic process, where enzymatically-active bacterial cells are used. In this regard, we have continued the search for potential producers of nitrilehydratase of the 4 soil samples obtained from the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences and 8 soil samples brought from the territory of JSC «Navoiyazot». The soil samples were inoculated into nutrient medium R and grown for two weeks, periodically adding 1% of acrylonitrile. Thereafter, serial dilutions have been made and inoculated on a solid nutrient medium S2M and incubated at 28-30 °C. In result, 102 bacterial strains have been isolated which able to grow on the nutrient medium S2M in presence 1% of acrylonitrile. The isolated bacteria by their morphological properties were assigned to the genus Bacillus – 41 strains, to the genus Pseudomonas – 36, to the genus Rhodococcus – 15 and to the genus Micrococcus – 10 strains. All isolated strains were grown in liquid nutrient media, and their biomass tested for transformation of acrylonitrile to acrylamide. In result of conducted research, it was found that Rhodococcus sp. – 2/1 and 2/2 strains form highly active nitrilehydratase activity of 220 and 200 U/mg, respectively, which effectively transformed acrylonitrile into acrylamide.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА
BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

СЕКЦИЯ

БИОМАТЕРИАЛЫ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ И МЕДИЦИНЕ

SECTION

BIOMATERIALS IN BIOTECHNOLOGIES AND IN MEDICINE

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

БИОМАТЕРИАЛЫ А МЕДИЦИНСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

М.И. Штильман

Центр «Биоматериалы», РХТУ им. Д.И.Менделеева

В последнее десятилетие отмечается растущий интерес к наукам и технологиям, связанным с жизнью человека и других живых организмов - медицине, биотехнологии, микробиологии, различным отраслям сельского хозяйства, пищевой и косметической промышленности и т.д.

Это также касается разработки и изучения материалов, предназначенных для применения в этих областях. Разнообразие химических веществ, используемых в этих материалах очень широко: металлы и сплавы, а также силикатные материалы занимаю важное место среди них. Тем не менее, самый широкий спектр применения связан с различными полимерами и материалами на их основе.

Следует отметить ряд важных областей применения полимеров в медицинских и биологических областях:

1. Материалы, используемые для создания имплантатов и эндопротезов.
2. Компоненты системы доставки лекарственных средств.
3. Полимерные биорегуляторы и биоцидов.
4. Материалы для создания биокатализаторов высокопроизводительных.
5. Сорбционных и мембранных материалов для разделения и очистки биологически активных веществ и продуктов, в медицине, биотехнологии и пищевой промышленности.
6. Материалы для биоанализа.
7. Материалы для биоинженерных технологий

Несмотря на огромное количество данных в литературе, в том числе большое количество обзоров, монографий, материалов конференций, отражающие прогресс в области применения полимеров в медицинских и биотехнологических областях, создание и исследование новых высокоэффективных макромолекулярных систем медико-биологического назначения активно продолжается.

BIOMATERIALS IN MEDICAL BIOTECHNOLOGY

M.I.Shtilman

Centre "Biomaterials" D.Mendeleyev University of chemical technology of Russia

In the last decades there is a growing interest in science and technology related to human life and other living organisms - medicine, biotechnology, microbiology, different branches of agriculture, food and cosmetic products and technologies, etc.

This also concerns development and study of materials designed for application in these fields. The variety of chemical substances used in these materials is very broad: metals and alloys, and silicate materials have a significant place among them. However, the broadest range of applications is associated with various polymers and materials based on them.

It should be noted a number of important areas of application of polymers in medical and biological areas:

1. Materials used for the creation of implants and endoprostheses.
2. The components of drug delivery systems.
3. Polymeric bioregulators and biocides.
4. Materials for creating high-performance biocatalysts.
5. The sorption and membrane materials for the separation and purification of biologically active substances and products in medicine, biotechnology and food industries.
6. Materials for bioanalysis.
7. Materials for Bioengineering Technologies

Despite the enormous amount of material in the literature, including a large number of reviews, monographs, conference proceedings, reflecting the progress in the application of polymers in the medical and biotechnological fields, the creation and study of new highly effective macromolecular systems, medico-biological appointments are actively ongoing.

.....

ДЛИНА ТЕЛОМЕРОВ КАК БИОМАРКЕР СТАРЕНИЯ У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ГЛИФОСАТА

Д. Цукалас, Э. Ваконаки, П. Фрагкиадаки, А. Алегкакис, С. Плайтис, К. Циминикаки, Г. Ваки, Э. Фрагкиадулаки, М. Тзатзаракис, А. Цацакис

Научно-исследовательская токсикологическая лаборатория медицинского факультета Университета Крита, Гераклион, Греция

Цель исследования: Теломера представляет собой повтор последовательности 5'GGTTAG3' в конце каждого плеча хромосомы, защищающий хромосому от деградации. Длина теломеры зависит от возраста, особенностей питания и общего стиля жизни. Цель настоящего исследования заключается в исследовании воздействия глифосата, применяемого фермерами, на длину теломер.

Материалы и методы: Из периферической крови изолировались лейкоциты метафазной пластинки. Длина теломер измерялась in situ методом трёхмерной количественной флуоресценции. Проводились процедуры гибридизации с использованием зонда пептид-нуклеиновой кислоты (ПНК) (C3TA2)3; были получены фотографии 10 метафаз каждого из фермеров. Длины теломер рассчитывались с использованием программного обеспечения Имидж-Джей (ImageJ). В качестве эталона длины использовалась длина теломер клеточной линии L5178Y-S.

Результаты. Группа по глифосату (ГГ) состояла из 9 мужчин, средний возраст которых был равен 51,2±14,4 года; при этом в контрольную группу вошли лица возрастом 49,5±10,3 года (p=0.708), выбранные из референтной базы данных (КГ). Медианная длина коротких теломер была оценена в 7238 оснований (нуклеотидов) ниже, чем контрольная группа 7308 оснований (нуклеотидов); каких-либо значимых различий не наблюдалось (p=0,917). Кроме того, положение ГГ групп в нормограмме длины короткой теломеры в зависимости возраста демонстрировало широкую дисперсию для ГГ-группы. Четыре случая находились ниже 50-го перцентиля и всего 2 случая – между 25-м и 75-м перцентилями при диапазоне от 4120 до 11202 оснований (нуклеотидов).

Вывод. Анализ данных не выявил значимых различий групп, подвергшихся воздействию глифосфата, от контрольных групп; наблюдалась широкая дисперсия измеренных значений длины теломер. Для

выявления возможного воздействия глифосата необходимо провести расширенное и более детальное исследование с большим числом участников, подвергшихся воздействию глифосата.

TELOMERES LENGTH AS AGEING BIOMARKER IN GLYPHOSATE USERS

D. Tsoukalas, E. Vakonaki. P. Fragkiadaki, A. Alegkakis, S. Plaitis, K. Tsiminikaki, G. Vaki, E. Fragkiadoulaki, M. Tzatzarakis, A. Tsatsakis

Laboratory ofToxicology Science &Research, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Purpose: Telomere is the repetition of 5'GGTTAG3' sequence at the end of all chromosome arms, that protects the chromosome of deterioration. Telomere's length depends on age, dietary habits and lifestyle. The aim of this study is to investigate the effect of glyphosate application in telomeres length by farmers.

Materials–methods: Metaphase spread leukocytes were isolated from peripheral blood. The telomere length measured by 3D Quantitative Fluorescence in situ Hybridization procedures with the use of (C3TA2)3 peptide nucleic acid (PNA) probe and collected photos from 10 metaphases of each farmer. Telomeres length were calculated with image-J used as reference length what one of L5178Y-S Cell Line.

Results. The glyphosate group (GG) is consisted of 9 men with a mean age of 51.2±14.4 and a selected from a reference database control group (CG) aged 49.5±10.3 (p=0.708). The median length of the short telomeres was estimated at 7238 bases lower than the control group 7308 bases but no significance differences were observed (p=0.917). Additionally, the position of GG groups in the short telomere length vs age normogram showed a wide dispersion for the GG group. Four cases were below the 50th percentile and only 2 cases were between 25th and 75th percentile, with a range of 4120 to 11202 bases.

Conclusion. Data analysis revealed no significant differences of glyphosate exposure in comparison with the control groups and a wide dispersion of short telomere length measures. A more extended and detailed sample participants exposed in glyphosate is needed in order to show a possible effect.

УДК 66.083.3

СВЕРХКРИТИЧЕСКИЕ ФЛЮИДЫ И ОРГАНИЧЕСКИЕ АЭРОГЕЛИ

Меньшутина Н.В

Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, Миусская пл., д.9
Тел.: (495) 495-00-29
e-mail: chemcom@muctr.ru

Были рассмотрены основные виды и применение сверхкритических флюидов. Аэрогели органической и неорганической природы были рассмотрены как вещества, получаемые в сверхкритических условиях, которые могут быть использованы как средства доставки лекарственных веществ, изоляционные материалы, матриксы для роста клеток и т.д.

Ключевые слова: сверхкритические флюиды, аэрогели, средства доставки лекарственных веществ, матриксы для роста клеток.

В последнее время сверхкритические флюиды находят применение в области получения и обработки полимеров: разделение моно-, олиго- и собственно полимеров, синтез и получение биоматериалов, создание наночастиц, импрегнация и создание высокопористых материалов.

Сверхкритическими флюидами (СКФ) называют состояние вещества, при котором исчезает различие между жидкой и газовой фазой. Вещества в сверхкритическом состоянии применяются в качестве заменителей органических растворителей в лабораторных и промышленных процессах. Наибольшее распространение в связи с доступностью получили сверхкритический диоксид углерода (СКДУ) и сверхкритическая вода. СКДУ не токсичен, не горюч, не взрывоопасен, дешев; сверхкритическое состояние достигается при параметрах выше 31^{0}С и 73.8 атм. Процессы с использованием СКДУ как растворителя относятся к «зеленой химии», они не загрязняют окружающую среду.

Сверхкритические технологии с использованием СКДУ в настоящее время широко используются в

флюидной экстракции для получения физиологически активных субстанций из растительного и животного сырья при производстве био-фармпрепаратов; в флюидной хроматографии для разделения изомеров, а также для анализа качества фармацевтических субстанций. СКФ начинают находить применение для очистки природных и синтетических полимеров, неорганических и функциональных материалов; для стерилизации термолабильных веществ.

Важным применением СКФ является возможность получения инновационных материалов аэрогелей с использованием золь-гель процессов. Аэрогели представляют собой сверхлегкие высокопористые вещества неорганической или органической природы, которые могут использоваться не только как промышленные материалы для тепло- и шумоизоляции, сорбции газов и паров, но и как материалы для медицины и как современные системы доставки лекарственных веществ в фармацевтике.

В качестве системы доставки лекарственных веществ исследовались аэрогели различных типов: неорганические на основе оксида кремния и органические, разрешенные фармакопейными статьями. Были получены аэрогельные матрицы различной природы (на основе альгината натрия, хитозана, пектина, крахмала, желатина и белков), изучались свойства получаемых материалов. Органические аэрогели имеют менее развитую площадь внутренней поверхности (300-700 м2/г), чем кремниевые (800-1000 м2/г), и больший средний диаметр пор: органические – 30 нм, неорганические – 10 нм. Кроме того, были получены аэрогели на основе полимолочной кислоты, а также гибридные аэрогели на основе альгината натрия, которые получали добавлением различных полимеров: Карбопол 940, Карбопол 974, Эудрагит, Плюроник. Было установлено, что аэрогельные матрицы-носители – нейтральны (не воздействуют на человеческий организм и не искажает действия АФИ). Органические аэрогели являются биоразлагаемыми.

Было протестировано два способа внедрения АФИ в аэрогельные матрицы: внедрение на стадии золь-гель процесса и внедрение путем адсорбции в среде сверхкритических флюидов (СКФ), что применимо только для растворимых в СКФ веществ. В качестве АФИ использовались такие вещества как: нимесулид, кетопрофен, ибупрофен, лоратадин, артемизинин, рифабутин. Установлено, что в аэрогельные матрицы может быть адсорбировано от 20-60 % АФИ. Композиция аэрогель-АФИ тестировалась на растворимость, биодоступность. Было установлено, что растворимость и биодоступность композиций выше, чем кристаллического АФИ

Применение аэрогелей для регенеративной медицины является новой и инновационной задачей, особенно в качестве матриксов для роста клеток. Проводились исследования по разработке технологии СКФ для получения аэрогелей на основе полисахаридов, протеинов (коллаген), гиалуроновой кислоты, а также гибридных аэрогелей, полученных как на основе органических, так и неорганических прекурсоров. Развитие СК технологии для получения уникальных медицинских материалов, быстрый подбор нужного по составу аэрогеля и предсказания поведения клеток на нем с привлечением математического и компьютерного моделирования создает благоприятные условия в области трансплантологии и регенеративной медицины.

Литература:

1. *C.A. Garcia-Gonzalez, M. Alnaief, I. Smirnova. Polysaccharide-based aerogels – Promising biodegradable carriers for drug delivery systems// Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 86. – P. 1425-1438.*
2. *K. Rinki, P. K. Dutta, A.J. Hunt, D.J. Macquarrie, J.H. Clark. Chitosan aerogels exhibiting high surface area for biomedical application: preparation, characterization, and antibacterial study// International Journal of Polymeric Materials. – 2013. – Vol. 60. – P. 988 – 999.*
3. *N. Menshutina, S. Ivanov, D. Lovskaya, V. Saprina, A. Lebedev. Process of production of aerogels based on polysaccharides for medical applications. SGEM2016 Conference Proceedings. Book6 Vol. 1, 281-288 pp. DOI: 10.5593/SGEM2016/B61/S24.037.13.12.2016).*

UDC 66.083.3

SUPERCRITICAL FLUIDS AND ORGANIC AEROGELS

Menshutina N. V.

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
Miusskaya Sq., 9, 125047, Moscow, Russia
Tel: (495) 495-00-29
E-mail: chemcom@muctr.ru

The main types and applications of supercritical fluids have been considered. The aerogels of organic and inorganic nature have been investigated as substances producing in supercritical conditions. These aerogels can be used as drug delivery systems, isolated materials, matrices for mammalian cell growth.

Key words: supercritical fluids, aerogels, drug delivery systems, matrices for cell growth.

Recently supercritical fluids have an application in the fields of production and treatment of polymers (mono-, oligo- and other ones), synthesis and production of biomaterials, nanoparticles production, impregnation and creation of high porous materials.

Supercritical fluids (SCFs) is called the substance state when there is no the difference between liquid and gaseous phases. Substances in supercritical state are used for change of organic solvents in laboratory and industrial scales. The most popular supercritical solvents are supercritical carbon dioxide (SC-CO_2) and supercritical water. SC-CO_2 is not toxic, combustible, highly explosive, it is cheap; the supercritical state is achieved under parameters higher then 31^{0}C и 73.8 atm. The processes with SC-CO_2 as a solvent belong to “green chemistry”, they don’t contaminate the environment.

Nowadays supercritical technologies with SC-CO_2 are widely used in fluid extraction to produce active substances from plant and animal raw materials for bio-pharmaceuticals; in fluid chromatography for isomers separation; for analysis of pharmaceutical substances quality. SCFs begin to apply for purification of nature and synthetic polymers, inorganic and functional materials, for sterilization of thermosensitive substances.

One of importance application of SCFs is the possibility of aerogel production using sol-gel process. Aerogels are super light materials with high porosity of inorganic and organic nature which can be used not only as industrial materials for heat and noise isolation, gas and vapors sorption, but and the material for medicine and drug delivery systems in pharmaceutics too.

As drug delivery systems the aerogels of different types have been investigated: inorganic on SiO_2 and organic permitted by pharmacopeia. The aerogel matrices have been produced from different substances (sodium alginate, chitosan, pectin, starch, gelatin and proteins), the aerogel properties were studied. Organic aerogels have less specific pore square (300-700 m2/g) then silicon ones (800-1000 m2/g) and bigger average pore diameter: organic – 30 nm, inorganic – 10 nm. Besides the aerogels have been produced based on PLA and hybrid ones based on sodium alginate with the additives of different polymers: Carbopol 940, Carbopol 974, Eudragit, Pluronic. It was established that aerogel matrices are neutral (do not influence to human organism and distort of API action). Organic aerogels are biodegradable.

Two methods of API implementation to aerogel matrices have been tested: implementation on sol-gel stage and implementation by adsorption in the media of supercritical fluids. The last method is usable only for the substances soluble in SCFs. Such substances as API were used: nimesulide, ketoprofen, ibuprofen, loratadine, artemisinin, rifabutin. It was established that about 20-60% API can be adsorbed into the aerogel matrices. Composition aerogel-API was tested on solubility, bioavailability. It was defined that the solubility and bioavailability of compositions are higher then from crystalline API.

The application of aerogels for regenerative medicine is new and innovative task, specifically as a matrix for cell growth. The investigations have been done for aerogels based on polysaccharides, proteins (collagen), hyaluronic acid and for hybrid aerogels based on organic and inorganic precursors. Development of SCFs technologies to produce unique medical materials, prompt choice of necessary aerogel composition and prediction of cell behavior on it by using of mathematical and computer modelling create the favorable conditions in the fields of transplantology and regenerative medicine.

References:

1. C.A. Garcia-Gonzalez, M. Alnaief, I. Smirnova. Polysaccharide-based aerogels – Promising biodegradable carriers for drug delivery systems// Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 86. – P. 1425-1438.
2. K. Rinki, P. K. Dutta, A.J. Hunt, D.J. Macquarrie, J.H. Clark. Chitosan aerogels exhibiting high surface area for

biomedical application: preparation, characterization, and antibacterial study// International Journal of Polymeric Materials. – 2013. – Vol. 60. – P. 988 – 999.
3. *N. Menshutina, S. Ivanov, D. Lovskaya, V. Saprina, A. Lebedev. Process of production of aerogels based on polysaccharides for medical applications. SGEM2016 Conference Proceedings. Book6 Vol. 1, 281-288 pp. DOI: 10.5593/SGEM2016/B61/S24.037.13.12.2016).*

УДК. 61.617—089; 66.661.11

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ ЭМБОЛОВ ДЛЯ ЗАКУПОРКИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

Белова М.С.[1], Асанова Л.Ю.[1], Жаворонок Е.С.[2], Степаненко В.Ю.[3], Чалых А.Е.[3] , Легонькова О.А.[1]

[1] ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия
117997, г. Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27
e-mail: ospolimed@mail.ru
[2] Московский технологический университет (МИТХТ), Москва, Россия
119571, г. Москва, проспект Вернадского, д. 86
[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук (ИФХЭ РАН)
119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4.

Изучены смачиваемость и поверхностная энергия твердых образцов полимера, представляющего собой основу эмболов для закупорки кровеносных сосудов из растворов *in situ*. Показано, что поверхностная энергия образцов, а также ее полярная и дисперсионная составляющие слабо изменяются при выдерживании в водной среде. Установлено, что полимерный эмбол должен хорошо смачиваться компонентами крови, а его поверхностная энергия несколько ниже поверхностной энергии культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, близких по природе к тканям стенок кровеносных сосудов.

Ключевые слова: кровеносный сосуд, эмболизация, раствор полимера, эмбол, поверхностная энергия, смачиваемость.

Настоящая работа посвящена исследованию поверхностной энергии и смачиваемости разрабатываемого для эмболизации кровеносных сосудов материала, а также мезенхимных стромальных клеток для определения сродства эмболизирующего состава к сосудам.

Сравнение смачиваемости твердой поверхности эмбола и поверхности ММСК показывает, что ММСК лучше смачиваются полярной водой и несколько хуже – менее полярным трикрезилфосфатом (краевые углы смачивания составляют 35.3 и 51.0°, соответственно); краевой угол смачивания поверхности ММСК диметисульфоксидом (33.7°) мало отличается от угла смачивания поверхности эмбола. При этом общая поверхностная энергия для ММСК (58.8 мДж/м^2) несколько выше γ_s^D поверхности эмбола – очевидно за счет более высокого значения полярной составУляющей (45.2 мДж/м^2). В то же время дисперсионная составляющая поверхности ММСК (13.5 мДж/м^2) несколько ниже γ_s^D поверхности эмбола. Другими словами, тенденция поверхности эмбола к смачиванию компонентами крови ниже, по сравнению с поверхностью ММСК, сходных по природе со стенками кровеносных сосудов.

Смачивание и поверхностная энергия твердых полимерных составов, сформированных из растворов полимеров путем разделения фаз в кровеносных сосудах *in situ* определяют принципиальную возможность их применения при эмболизации. Твердый эмбол из раствора ацетата целлюлозы в диметилсульфоксиде, приведенного в контакт с водной средой, формируется практически мгновенно. Однако некоторое время из него продолжают выходить остатки растворителя и пластификатора, что ведет к некоторому уменьшению полярности его поверхности. Тем не менее, расчеты показывают, что эта поверхность должна хорошо смачиваться компонентами крови, хотя и несколько хуже, по сравнению с биологическими тканями. Таким образом, разрабатываемые полимерные растворы являются пригодными для практической эмболизации кровеносных сосудов.

UDC. 61.617—089; 66.661.11

SURFACE ENERGY AND WETTABILITY OF SOLID POLYMER FILMS IN THE SIMULATION OF PROPERTIES OF EMBOLI FOR BLOCKAGE OF THE BLOOD VESSELS

Belova M.S.[1], Asanova L.Yu.[1], Zhavoronok E.S.[2], Stepanenko V.YU.[3], Chalyh A.E.[3] Legonkova O.A.[1]

[1] The Institute of Surgery named after A.V. Vishnevsky, Moscow, Russia
117997, Moscow, Bolshaya Serpukhovskaya Street, 27
e-mail: ospolimed@mail.ru
[2] Moscow Technical University (MITHT), Moscow, Russia
119571, Moscow, Vernadsky prospect, 86
[3] Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry named after A.N. Frumkin, Russian Academy of Sciences
119071, Moscow, Leninsky Prospect, 31.

The wettability and surface energy of the solid polymer samples which is the basis for emboli occlusion of blood vessels were studied in situ solutions. It was shown that the surface energy of the samples, as well as its dispersive and polar components vary slightly when exposed to an aqueous environment. It is found that the polymer embolus must be well wetted with blood components, and its surface energy is slightly lower than surface energy of multipotent mesenchymal stromal cells, similar in nature to the tissues of the blood vessel walls.

Key words: blood vessel, embolization, polymer solution, embolus, surface energy, wettability

The present work is devoted to the study of the surface energy and wettability of the material, developed for clogging of blood vessels as well as mesenchymal stromal cells to determine the affinity of the embolic composition to the vessels.

Comparison of wetting of a solid surface of the emboli and the surface of MSC indicates that MSC are better wetted by the polar water and slightly worse – by less polar tricresylphosphate (contact angles up 35.3 and 51.0°, respectively); the contact angle of dimethylsulfoxide on the surface of the MSC (33.7°) differs little from the contact angle on the surface of emboli. The total surface energy of MSC (58.8 mJ/m^2) is slightly above the γ_s^D of the embolis' surface - obviously due to the higher value of the polar component (45.2 mJ/m^2). At the same time the dispersion component of the surface MMSC (13.5 mJ/m^2) is lower than γ_s^D of the embolis' surface. In other words, the tendency of wetting embolis' surface with blood components is lower, compared to the surface of MMSC, similar in nature to the walls of blood vessels.

Wetting and surface energy of the solid polymer formulations formed from polymer solutions by phase separation in the blood vessels *in situ* define the possibility of their use in embolization. The solid embolus from the solution of cellulose acetate in DMSO, brought into contact with an aqueous medium, is formed almost instantaneously. However, while it is ejected from the residual solvent and a plasticizer, which leads to some decrease in polarity of its surface. However, calculations show that this surface must be wetted well with blood components, although slightly worse compared with biological tissues. Thus, polymer solutions are being developed for practical suitable embolizing blood vessels.

.....

УДК 615.45.015

НАНОРАЗМЕРНЫЕ ФОРМЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ

Кусков А.Н., Куликов П.П., Лусс А.Л., Горячая А.В., Штильман М.И.

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

Получены наноразмерные формы различных лекарственных веществ на основе амфифильных полимеров. Новые системы доставки в виде модифицированных липосом и полимерных наночастиц и способны иммобилизовать лекарственные субстанции, повышая безопасность и эффективность их применения.

Ключевые слова: амфифильный полимер; наночастица; липосома; мицелла; система доставки; контролируемое выделение; лекарственная форма.

Путем радикальной полимеризации N-винилпирролидона в присутствии передатчика-инициатора цепи синтезированы амфифильные полимеры с контролируемой молекулярной массой гидрофильного полимерного фрагмента и одной концевой алифатической гидрофобной группой различного строения.

С использованием самосборки молекул амфифильных полимеров и их гидрофобных взаимодействий с липидами в водных средах получены два типа наноразмерных носителей – полимерные наночастицы и модифицированные полимерами липосомы. Определены основные характеристики полученных систем, оптимальные условия их получения, установлена их высокая стабильность в биологических средах и при хранении. Показана низкая цитотоксичность и острая токсичность амфифильных полимеров и наноносителей на их основе в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Установлено, что разработанные полимерные наносомальные носители способны с высокой эффективностью иммобилизовать как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные (например, белковой природы) гидрофобные биологически-активные и лекарственные вещества, а получаемые при этом новые лекарственные формы обеспечивают пролонгированное контролируемое выделение активного компонента, снижают его побочную токсичность с сохранением или повышением специфической биологической активности по отношению к культурам клеток или в организме экспериментальных животных.

References:

1. *Kuskov A.N., Kulikov P.P., Shtilman M.I., Rakitskii V.N., Tsatsakis A.M. Amphiphilic poly-N-vynilpyrrolidone nanoparticles: Cytotoxicity and acute toxicity study // Food and Chemical Toxicology. 2016. V. 96. P. 273–279.*
2. *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, doi: 10.1016/j.nano.2016.11.006.*

UDK 615.45.015

NANO-SCALED DRUG DELIVERY FORMS ON THE BASIS OF AMPHIPHILIC POLYMERS

Kuskov A.N., Kulikov P.P., Luss A.L., Goryachaya A.V., Shtilman M.I.

D.I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
Miusskaya sqr., 9, Moscow 125047
e-mail: a_n_kuskov@mail.ru

Novel nano-scaled administration forms for different types of drugs are developed on the basis of amphiphilic polymers. Such drug delivery systems as polymer-modified liposomes and polymeric nanoparticles are able to immobilize drug substances increasing efficiency and safety of their application.

Key words: amphiphilic polymer; nanoparticle; liposome; micelle; drug delivery system; controlled release; biocompatibility; toxicity; drug form.

The new amphiphilic polymers with adjusted molecular weight of hydrophilic polymeric fragment and different length of aliphatic anchor hydrophobic group were synthesized on the basis of N-vynilpyrrolidone using radical polymerization in the presence of chain transferor-initiator and their main properties were studied.

Two types of nano-scaled drug carriers, such as polymeric nanoparticles and polymer-modified liposomes were prepared by means of amphiphilic polymer molecules self-assembling or their interaction with lipid hydrophobic fragments in aqueous media. The characteristics of prepared systems such as size, morphology and surface charge were investigated and optimal nanoparticles preparation conditions were determined. The high stability of nano-carriers in biological media and during long-term storage was revealed. It was shown that synthesized polymers and nanosomal particles on their basis possess low cytotoxicity and acute toxicity in experiments *in vitro* and *in vivo*.

It was also determined that developed polymeric nano-carriers under mild conditions are able to immobilize both low-molecular and high-molecular (e.g. proteins) hydrophobic biologically active substances and drugs of different nature and structure with high efficiency and capacity. Due to introduction into nanoparticles hydrophobic

core drug is masked and protected from destabilizing factors and inactivation in organism. Wherein, prepared novel drug forms provides prolonged and controlled release of active substance, at the same time decreasing its side toxicity with remaining or increasing its specific biological activity against cell cultures or in experimental animals organisms.

References:
1. *Kuskov A.N., Kulikov P.P., Shtilman M.I., Rakitskii V.N., Tsatsakis A.M. Amphiphilic poly-N-vynilpyrrolidone nanoparticles: Cytotoxicity and acute toxicity study // Food and Chemical Toxicology. 2016. V. 96. P. 273–279.*
2. *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, doi: 10.1016/j.nano.2016.11.006.*

УДК: 616.12-089-77:615.46

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ КАЛЬЦИФИКАЦИИ БИОПРОТЕЗОВ ДЛЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ

Кудрявцева Ю.А., Глушкова Т.В., Резвова М.А., Насонова М.В., Шишкова Д.К., Барбараш Л.С.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г.Кемерово, Россия
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6, e-mail: kudrua@kemcardio.ru

Разработана модель ускоренной кальцификации in vitro, позволяющая получать данные о кальций связывающей способности биоматериала. Обработка поливиниловым спиртом снижает риск кальцификации консервированного биоматериала.

Ключевые слова: биологические протезы, сердечно-сосудистая хирургия, кальцификация, модификация материала.

Биологические протезы клапана сердца имеют значительные преимущества перед механическими протезами – отсутствие необходимости в пожизненной антикоагулянтной терапии, физиологический поток крови через клапан, низкий риск тромбоза протеза, более высокое качество жизни. В то же время, биопротезы склонны к кальцификации биологической части, что приводит со временем к их дисфункции и необходимости проведения повторной операции по замене протеза, тем самым, ограничивает применение биопротезов. Существует несколько теорий кальцификации биоматериала, которые легли в основу разработки технологий, направленных на снижение кальций связывающей активности биоматериала. Несмотря на достигнутые успехи, значительного прогресса в этой области достичь не удалось. Как показывают результаты клинического применения - до 20% имплантированных биопротезов подвергаются кальцификации, независимо от технологии консервации биоткани.

Целью настоящей работы явилась – разработка новых подходов и оценка их эффективности в снижении кальций-связывающей активности биоматериала.

Материалы и методы. Перикард крупного рогатого скота консервировали по стандартным методикам диглицидиловым эфиром этиленгликоля (ДЭЭ) и глутаровым альдегидом (ГА). Антикальциевую модификацию проводили поливиниловым спиртом с разными молекулярными массами и степенями гидролиза ацетатных групп. Полимер растворяли в физиологическом растворе при нагревании. Образцы перикарда размером 7x7 cm помещали в 100 ml 5% раствора поливинилового спирта и выдерживали при температуре 37ºС и постоянном перемешивании в течение 5 часов. Образцы извлекали, трижды промывали физиологическим раствором. Оценку физико-механических свойств проводили при помощи универсальной испытательной машины Zwick/Roell Z2.5 («Zwick GmbH & Co.KG», Германия) путем продольного одноосного растяжения образов в соответствии с ГОСТ 270-75. Оценивали: прочность (по максимальному напряжению при растяжении), эластичность (по относительному удлинению) и модуль упругости. Устойчивость к кальцификации определяли методом ускоренной кальцификации in vitro. Готовили смесь на основе питательной среды DMEM и сыворотки альбумина (FBS), имитирующую по содержанию ионов плазменную жидкость организма человека. Для ускорения процесса кальцификации концентрации ионов увеличивали в 10 раз по сравнению с физиологичными. Образцы перикарда размером 5x5 mm помещали в 10 mM раствор, содержащий 1.85 ml (DMEM + 10% FBS), 44 µl $CaCl_2$ и 100 µl Na_2HPO_4. Выдерживали в CO_2-инкубаторе при температуре 37ºС и концентрации углекислого газа 5%. Эксперимент проводили в стериль-

ных условиях. Степень кальцификации оценивали после первой и второй недели эксперимента методом гистологического анализа.

Результаты эксперимента показали отсутствие изменений физико-прочностных характеристик образцов перикарда, модифицированных поливиниловым спиртом, по сравнению с необработанными. По итогам исследования устойчивости материала к кальцификации методом in vitro было отмечено снижение уровня кальцификации модифицированных образцов, обработанных поливиниловым спиртом с молекулярной массой полимера 67,000 и степенью гидролиза ацетатных групп 88%, по сравнению с необработанными. Данный эффект отмечен у образцов консервированных как диглицидиловым эфиром этиленгликоля, так и глутаровым альдегидом.

Выводы. Модель ускоренной кальцификации in vitro является удобной, воспроизводимой и позволяет в течение 14 дней получать данные о кальций связывающей способности биоматериала. Обработка поверхности консервированного биоматериала поливиниловым спиртом снижает риск кальцификации.

UDC: 616.12-089-77:615.46

NEW APPROACHES FOR ASSESSMENT AND PREVENTION OF BIOPROSTHESIS CALCIFICATION FOR CARDIOVASCULAR SURGERY

Kudryavtseva Y.A., Glushkova T.V., Rezvova M.A., Nasonova M.V., Shishkova D.K., Barbarash L.S.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Sosnovy Boulevard 6, Kemerovo, 650002, Russia
e-mail: kudrua@kemcardio.ru

A model of rapid calcification in vitro, allowing to obtain data on the calcium-binding ability of the biomaterial. Surface canned biomaterial polyvinyl alcohol reduces the risk of calcification.

Key words: bioprosthesis, cardiovascular surgery, calcification, material modification.

Biological heart valve prostheses have significant advantages over mechanical prostheses: no need for lifelong anticoagulation therapy, physiological blood flow through the valve prosthesis, low risk of thrombosis, a higher quality of life. At the same time they are prone to calcification of its biological part that eventually leads to their dysfunction and cause the need for re-operation to replace prosthesis, thereby limiting the use of bioprostheses. There are several theories of calcification of the biomaterial, which formed the basis for the development of technologies aimed at reducing the calcium binding activity of the biomaterial. Despite this success, significant progress had not been achieved in this area. As shown by the results of clinical application – up to 20% of the implanted bioprostheses undergo calcification, regardless of biological tissue preservation technology.

The aim of this work was the development of new approaches and evaluation of their effectiveness in reducing the calcium-binding activity of the biomaterial.

Materials and methods. The pericardium cattle were preserved according to standard procedures of ethylene glycol diglycidyl ether (DEE) and glutaraldehyde (GA). Anticalcium modification was carried out with polyvinyl alcohol with different molecular weights and degrees of hydrolysis of the acetate groups. The polymer was dissolved in saline with heat. Samples pericardium measuring 7x7 cm was placed in a 100 ml 5% polyvinyl alcohol solution and kept at a temperature of 37ºC and a constant stirring for 5 hours. Samples were removed and washed three times with saline solution. Assessment of physical-mechanical properties were carried out using the universal testing machine Zwick / Roell Z2.5 («Zwick GmbH & Co.KG», Germany) by longitudinal uniaxial stretching images according to Russian National Standart № 270-75 «Rubber. Method of the determination elastic and tensile stress-strain properties». Evaluated: strength (overvoltage tensile), flexibility (for elongation), and modulus of elasticity. Resistance to calcification was determined by an accelerated calcification in vitro. A mixture of a nutrient medium based on DMEM and serum albumin (FBS), simulating plasma ion content of human body fluid. To accelerate the calcification process of ion concentration was increased 10 times compared to the physiological. Pericardium samples 5x5 mm were placed in 10 mM solution containing 1.85 ml (DMEM + 10% FBS), and 44 µl CaCl2 100 µl Na2HPO4. Incubated in CO2-incubator at 37ºC and carbon dioxide concentration of 5%. The experiment was conducted under sterile conditions. The degree of calcification was evaluated after the first and second weeks of the experiment by histological analysis.

The experimental results showed no changes in physical strength characteristics pericardium samples modified polyvinyl alcohol, compared to untreated. According to the research material to the stability in vitro method of calcification was observed reducing calcification of modified samples treated with polyvinyl alcohol

having a molecular weight of 67,000 and a degree of polymer hydrolysis of acetate groups of 88%, compared to untreated. This effect was observed in both samples preserved ethylene glycol diglycidyl ether, and glutaraldehyde.

Conclusions. Model of rapid calcification in vitro is a convenient, reproducible and allows for 14 days of receiving the data on the calcium-binding ability of the biomaterial. Surface canned biomaterial polyvinyl alcohol reduces the risk of calcification.

УДК 57.012

3Д МАТРИКСЫ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА ИЗ РАСТВОРОВ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА С БЕЛКОМ: БЕЛОК В ВОЛОКНЕ, НА ПОВЕРХНОСТИ ВОЛОКНА И В РАСТВОРЕ

Черноносова В. С.[1,2], Степанова А. О. [1,2], Квон Р. И.[3], Ларичев Ю.В.[3], Лактионов П. П.[1,2]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук; [2]Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина, [3]Институт катализа им. Г.К. Борескова, Новосибирск, Россия
630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
e-mail: lakt@niboch.nsc.ru

Методом электроспиннинга изготовлены 3Д матриксы из растворов поликапролактона с сывороточным альбумином. Показано, что белок частично высвобождается из матриксов; концентрация белка в поверхностном слое выше, чем в среднем в волокне; белок прочно связан с поверхностью волокна и может взаимодействовать с поверхностными рецепторами клеток.

Ключевые слова: поликапролактон; 3Д матриксы; электроспиннинг; ЧСА; ультраструктура волокна; высвобождение белка; поверхность волокна.

Рациональный дизайн взаимодействия имплантируемых 3Д матриксов с окружающими тканями и клетками является одной из основных задач тканевой инженерии. Таким образом, исследование тонкой структуры 3Д матриксов, их поверхности, процессов протекающих на разделе сред необходимо для разработки тканеинженерных конструкций. Представленное исследование посвящено исследованию строения волокон 3Д матриксов, изготовленных методом электроспиннинга из растворов синтетического полимера поликапролактона (ПКЛ) с белком – человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), процесса высвобождения белка из волокон и его экспонирования на поверхности волокон.

Для исследования структуры волокон, строения поверхностного слоя и высвобождения белка были использованы такие методы как малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР), рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), иммуноаналитические, биохимические методы и методы культуры тканей.

При помощи МУРР показано, что ЧСА в составе волокна находится в составе наночастиц разного размера, причем молекулы ПКЛ интегрированы в частицы белка. При помощи иммунохимической детекции обнаружено, что сразу после смачивания из волокон высвобождается часть белка, причем в составе высвобождающегося белка по данным РФЭС содержится не менее 30% ПКЛ (по весу). Оставшийся белок прочно связан с поверхностью волокна, и по данным РФЭС и ТЭМ концентрация ЧСА в поверхностном слое существенно выше, чем в среднем в волокне. Белок поверхностного слоя частично гидролизуется протеиназой К и может опознаваться рецепторами клеток линии HepG-2. Полученные данные могут быть использованы для рационального дизайна тканеинженерных конструкций и матриксов с программируемой доставкой дополнительно введенных компонентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-15-00493.

УДК 57.012

3D MATRICES PRODUCED BY ELECTROSPINNING FROM SOLUTIONS OF POLYCAPROLACTONE WITH PROTEIN: PROTEIN IN FIBERS, ON FIBER SURFACE AND OUT OF FIBERS

Chernonosova V. S.[1,2], Stepanova A. O.[1,2], Larichev Y. V.[3], Kvon R. I.[3], Laktionov P. P.[1,2]

[1] Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, [2] Siberian state biomedical research center name ac. E.N. Meshalkin, [3] Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia.
630090, Novosibirsk, pr. Lavrentieva 8
e-mail: lakt@niboch.nsc.ru

3D matrices were produced from solutions of polycaprolactone with human serum albumin. The part of the protein leaves the fibers right after soaking with water, concentration of the protein in a surface layer is higher than in average in fiber, the remaining protein stays tightly bound to fibers for a long time and surface-exposed protein is recognized by cell receptors.

Key words: polycaprolactone; 3D matrices; electrospinnin; human albumin; fiber ultrastructure; protein release; fiber surface.

Rational design of interaction of 3D matrices implanted with surrounding tissues and cells is one of the main objectives of tissue engineering. Thus study of fine structure of 3D matrices, their surface, and processes held on the fiber surface are necessary for designing of tissue-engineering constructs. The present study devoted to investigation of fine structure of fibers of 3D matrices produced by electrospinning from the solutions of polycaprolactone (PCL) with human serum albumin (HSA), the study of protein release from fibers and it's exposure on the fiber surface.

To study fiber structure, and protein release such methods as Small-angle X-ray scattering (SAXS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), immunoassay, biochemical methods and methods of tissue culture were used.

Using SAXS HSA was shown to be presented in fibers as nanoparticles of different size and molecules of PCL are integrated in protein particles. Using immunoassay for HSA it was shown that part of protein leave fibers immediately after soaking with water and XPS demonstrates presence of no less than 30% (w/w) PCL in the protein released. Remaining protein stays tightly bound to fibers for a long time and in accordance to XPS and TEM data the protein concentration on the fiber surface is higher than the average concentration in fiber. The surface-exposed protein is recognized by cell receptors and is partially hydrolyzed by proteinase K. The data obtained may be useful for rational design of electrospun scaffolds intended for drug delivery and tissue engineering.

This work was supported by the Russian Science Foundation (No: 14-15-00493).

.....

УДК 615.462-036.5

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ КОНСТРУКТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ 3D-ПРИНТИНГА И ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ.

Каралкин П.А.[1], Сергеева Н.С.[1], Комлев В.С.[2], Свиридова И.К.[1], Кирсанова В.А.[1], Ахмедова С.А.[1], Кувшинова Е.А.[1], Шанский Я.Д.[1], Баринов С.М[2].

[1] Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский радиологический центр» Минздрава России, 125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, д. 3.
[2] ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Россия. 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 49.

Разработана технология получения функционализированных антибиотиком ванкомицином трехмерных

конструкций (на основе альгината, фосфатов кальция и желатина) методом 3D-принтинга и показана их антибактериальная активность в in vitro и in vivo тестах с сохранением остеопластических свойств.

Ключевые слова: 3D-принтинг, фосфаты кальция, полисахариды, трехмерные конструкции, костные дефекты, антибиотики.

Актуальность: Разработка биоматериалов для восстановления костных дефектов остается актуальной проблемой, что обусловлено распространенностью патологических состояний костной ткани и неудовлетворительными результатами их лечения [1]. Реабилитация этой категории больных возможна лишь при достижении структурной и функциональной целостности костной ткани, что требует адекватных остеопластических материалов, в том числе способных осуществлять адресную доставку в костные дефекты лекарственных средств [2]. К сожалению, до сих пор не удавалось создать такие синтетические материалы, что обосновывает актуальность настоящего исследования.

Цель: создание биоинспирированных наноструктурированных функционализированных антибиотиками материалов, адаптированных к технологии прототипирования, для замещения костных дефектов.

Материалы и методы: Изготовление экспериментальных образцов трехмерных конструкций (ЭОТК) осуществляли по разработанным и защищенным заявками на патенты [3], технологиям на основе альгината натрия, фосфатов кальция (КФ) и желатина.

Исследование морфологии поверхности ЭОТК, состава, прочностных характеристик, текучести и вязкости «чернил» проводили с использованием сканирующей электронной микроскопии (электронный микроскоп Tescan VEGA II), ИК -спектроскопии (ИК-Фурье спектрометр Nicolet-380, ThermoScientific), механических испытаний (испытательная машина Instron ElectroPuls E3000, США). Исследования цитотоксичности напечатанных конструктов in vitro выполнены на модели клеточных культур фибробластов человека и линии остеосаркомы MG-63.

Разработана биологическая модель для исследования динамики выхода антибиотика (ванкомицина) из ЭОТК, насыщенных тремя способами: инфильтрацией водными растворами, инкорпорацией на модифицированную ванкомицином поверхность и добавлением в состав гидрогеля для печати. Посредством спектрофотометрии изучена эффективность указанных способов насыщения конструктов лекарственным препаратом и динамика его выхода из конструктов. Кроме того, эффективность трех способов насыщения ЭОТК ванкомицином оценивали in vitro по подавлению роста тестового штамма бактерий St. aureus ATCC 6538-P.

Исследование бактериостатического/бактерицидного действия ЭОТК, насыщенных ванкомицином, осуществляли на модели эксцизионной инфицированной раны на коже крыс.

Исследования биосовместимости функционализированных образцов прототипов трехмерного каркаса осуществляли на модели подкожной имплантации ЭОТК мышам *BDF1* с последующей гистологической экспертизой.

Для *in vivo* исследования остеокондуктивных потенций функционализированных ЭОТК использована модель костного дефекта - краевая резекция большеберцовой кости крыс-самцов линии *Wistar* (сроки наблюдения до 6 месяцев).

Результаты: Разработаны три методики насыщения ЭОТК антибиотиком: а) путем инфильтрации готового каркаса водным раствором лекарственного средства, б) путем введения препарата в состав «чернил» для печати ЭОТК, в) путем создания на поверхности готового ЭОТК дополнительного слоя ФК, содержащего искомое лекарственное средство. Все исследования этапа выполнены на ЭОТК состава альгинат натрия/желатин/октокальциевый фосфат (56/14/30 % масс.).

Установлено, что количества включенного в ЭОТК ванкомицина и динамика его выхода зависят от способа насыщения; наиболее интенсивный выход лекарственного препарата из конструктов наблюдался в модельной системе в первые часы инкубации и завершался к 1-6 суткам.

Выявлена выраженная антибактериальная активность ЭОТК (in vitro), насыщенных ванкомицином всеми тремя способами. In vivo показано, что имплантированные ЭОТК с ванкомицином эффективно препятствуют развитию воспалительного инфекционного процесса, индуцированного в коже введением *Staphylococcus aureus* в концентрации 10^8 КОЕ/мл.

Установлено, что введение ванкомицина в состав чернил для печати не влияет на биосовместимость ЭОТК.

На модели дефекта большеберцовой кости крыс показано, что функционализация ЭОТК ванкомицином в процессе 3D печати сохраняет их остеопластические потенции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России (соглашение № 14.604.21.0132 от 21.20.2014 г. *ID: RFMEFI60414X0132)*

Литература:
1. *Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions// J Orthop Surg Res. 2014. Vol. 9. № 1. P. 18-42.*
2. *Kolk A., Handschel J., Drescher W. et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials// J Craniomaxillofac Surg. 2012. Vol. 40. № 8. P. 706-718.*
3. *Заявка на патент РФ № 2016126010, 29.06.2016.*

УДК 615.462-036.5

DEVELOPMENT OF APPROACHES FUNCTIONALIZATION WITH DRUGS OF 3D-PRINTED CONSTRUCTS BASED ON POLYSACCHARIDES AND CALCIUM PHOSPHATE AND INTENDED FOR REPLACEMENT OF BONE DEFECTS

Karalkin P.A.[1], Sergeeva N.S.[1], Komlev V.S.[2], Sviridova I.K.[1], Kirsanova V.A.[1], Akhmedova S.A.[1], Shanskiy Ya.D.[1], Kuvshinova E.A.[1], Barinov S.M.[2]

[1] National Medical Research Radiological Center of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia. 125284, Moscow, 2-oy Botkinskiy proezd, d.3.
[2] A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. 119991, Moscow, Leninskiy prospect, d. 49.

The technology of 3D printing and functionalization of constructs based on sodium alginate, gelatin and calcium phosphate with antibiotic vancomycin was developed. Antibacterial activity of three-dimensional constructs as well as their osteoplastic potencies were demonstrated by means of *in vitro* and *in vivo* tests.

Key words: 3D printing, calcium phosphates, polysacharides, 3D constructs, bone defects, antibiotics.

Background: The development of biomaterials for restoring of bone defects remains an urgent problem caused by the prevalence of pathological conditions of bone and unsatisfactory results of current treatment methods [1]. The rehabilitation of this category of patients is possible only after fell restoration of the structural and functional integrity of the bone tissue that requires adequate osteoplastic materials, possessing the ability to carry out targeted drug delivery in bone defects [2]. Unfortunately, until now, it was not possible to create such synthetic materials and it actualizes the relevance of the present study.

The aim of study: to create bioinspired nanoconstructd functionalized with antibiotic materials adapted to prototyping technologies for replacement of bone defects.

Materials and Methods: The production of experimental models of three-dimensional constructs (EMTC) performed by self-developed and protected by patent applications [3] technology, implicated sodium alginate, calcium phosphate (CP) and gelatin.

The study of EMTC's surface morphology, composition, strength characteristics, and also ink's fluidity and viscosity was carried out using a scanning electron microscope (electron microscope Tescan VEGA II), infrared spectroscopy (FT-IR spectrometer, Nicolet 380, ThermoScientific), mechanical testing (testing machine Instron ElectroPuls E3000, USA). The cytotoxicity of 3D printed constructs was assessed by *in vitro* model performed on human fibroblasts and MG-63 osteosarcoma cell cultures.

Antibiotic (vancomycin) release kinetic from saturated EMTC was studied in a biological model. The saturation of constructs we performed in one of three ways: by the infiltration of constructs with aqueous solutions, by the incorporation of vancomycin into a biomimetically-modified surface, and by the addition of antibiotic to the hydrogel for printing. Spectrophotometry was used to study the effectiveness of three mentioned methods of vancomycin saturation and the dynamic of its release from the constructs. Furthermore, the effectiveness of saturation was evaluated in vitro by means of growth inhibition test in term of bacterial strain *St. aureus* ATCC 6538-P.

The research of bacteriostatic / bactericidal activity of saturated with vancomycin EMTC was carried out in the model of infected skin wound in rats.

Biocompatibility studies for functionalized EMTC samples we performed after their subcutaneous implantation in *BDF1* mice with subsequent histological examination.

Osteoconductive potencies of functionalized EMTC were evaluated *in vivo* using animal model of bone defects - marginal tibia resections in male *Wistar* rats with periods of observation up to 6 months.

Results: We developed three methods of EMTC saturation with vancomycin: a) by infiltration of printed constructs with drug aqueous solution, b) by administration to the "ink" for printing of EMTC, c) by creating on the

surface of printed construct the additional layer of calcium phosphates containing the desired drug. All studies were performed on EMTC consisted of sodium alginate / gelatin / octacalcium phosphate in ratios of 56/14/30 wt. percentage.

It was found, that the amount of incorporated in EMTC vancomycin and its release kinetic depend on the saturation process; moreover, the most intense release of the drug from the constructs was observed in the early hours of incubation and almost completely finished in 1-6 days.

We determined that there was a substantial *in vitro* antibiotic activity in EMTC, saturated with vancomycin in all three ways. *In vivo* tests showed that vancomycin released from implanted EMTC effectively hinder the development of an infectious inflammatory process induced by administration of 10^8 CFU/ml *Staphylococcus aureus* to the skin wounds.

We also found that the administration of vancomycin into the hydrogel for printing does not affect the biocompatibility of EMTC.

The model of the tibia defect in rats has shown that functionalization of EMTC with vancomycin during the 3D printing process preserve their osteoplastic potency.

The Russian Ministry of Science and Education (grant No. 14.604.21.0132, ID: RFMEFI60414X0132) supported this work.

References:
1. *Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions// J Orthop Surg Res. 2014. Vol. 9. № 1. P. 18-42.*
2. *Kolk A., Handschel J., Drescher W. et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials// J Craniomaxillofac Surg. 2012. Vol. 40. № 8. P. 706-718.*
3. *Patent application RU 2016126010, 29.06.2016.*

.....

УДК 57.014+57.012

СВОЙСТВА 3Д МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИУРЕТАНОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА

Черноносова В. С., Гостев А. А., Гао Ю., Карпенко А. А., Лактионов П. П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук; Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия
630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
e-mail: vera_mal@niboch.nsc.ru

Методом электроспиннинга получены волокнистые 3Д матриксы из различных смесей полиуретанов (Tecoflex EG-80A или Pellethane 2363-80A) с желатином. Исследована их прочность, стабильность в водной среде, биосовместимость в экспериментах in vitro. Полученные данные демонстрируют, что 3Д матриксы, изготовленные методом электроспиннига на основе полиуретанов, могут быть использованы для инженерии сосудов.

Ключевые слова: полиуретановые 3Д матриксы; электроспиннинг; биомеханика; биосовместимость.

Важными свойствами полимера используемого для изготовления тканеинженерных конструкций являются биосовместимость и стабильность механических свойств в процессе эксплуатации. Полиуретаны представляют собой перспективный класс полимеров для тканевой инженерии, поскольку наряду с хорошими механическими характеристиками, обладают био- и гемосовместимостью. В представленной работе исследованы свойства 3Д матриксов, изготовленных методом электроспиннинга из Tecoflex EG-80A и Pellethane 2363-80A, которые различаются между собой только химической природой жесткого сегмента.

3Д матриксы были изготовлены из растворов 3-7 % (вес/объем) полиуретана с добавлением 5-20 % (вес/вес) желатина относительно полимера в гексафторизопропаноле. По данным сканирующей электронной микроскопии полученные матриксы представляли собой волокнистые структуры с толщиной волокон 1,12±0,44÷1,39±0,6 мкм и размером пор 3,6±1,3÷5,8±2,7 мкм.

Было показано, что соотношение полиуретана и белка в растворе для электроспиннинга влияет на механические свойства матриксов. Прочность на разрыв для матриксов из Tecoflex EG-80A с желатином

составляет 10.8±0.3 ÷ 15.6±1.8 мПа, а для матриксов из Pellethane 2363-80A с желатином от 8,1±1,2 ÷ 8,4±0,5 мПа в зависимости от концентрации желатина. Следует отметить, что увлажнение материалов на основе Tecoflex EG-80A приводит к уменьшению прочности в области упругой деформации как минимум в 1,5 раза, и не оказывает влияние на прочность матриксов на основе Pellethane 2363-80A.

Обнаружено, что инкубация 3Д матриксов в фосфатном буфере при 37°C и 5% CO_2 в течение месяца приводит к изменению структуры волокон из Tecoflex EG-80A, однако практически не влияет на их прочность. Показано, что изменение структуры связано с высвобождением белка из структуры волокна. Показано, что матриксы из Pellethane 2363-80A с желатином при намокании не изменяют структуры и не теряют механических свойств.

Биосовместимость 3Д матриксов на основе полиуретанов была исследована в экспериментах *in vitro* с использованием эндотелиальных клеток человека. Показано, что клетки эффективнее адгезируют и пролиферируют на материалах из Tecoflex EG-80A по сравнению с матриксами из Pellethane 2363-80A. По данным флуоресцентной микроскопии с использованием красителей Cell Tracker Orange и SYBR Green I показано, что морфология эндотелиальных клеток на матриксах практически не отличается от морфологии клеток на культуральном пластике.

Таким образом, 3Д матриксы на основе полиуретанов с добавлением желатина, могут быть использованы для изготовления тканеинженерных конструкций с высокой прочностью, эластичностью и биосовместимостью.

УДК 57.014+57.012

PROPERTIES OF ELECTROSPUN POLYURETHANE-BASED 3D MATRICES

Chernonosova V. S., Gostev A. A., Gao Y., Karpenko A. A., Laktionov P. P.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian state biomedical research center name ac. E.N. Meshalkin, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, pr. Lavrentieva 8
e-mail: vera_mal@niboch.nsc.ru

Fibrous 3D matrices were produced by the electrospinning from blends of polyurethanes (Tecoflex EG-80A or Pellethane 2363-80A) with gelatin. Physical and chemical properties of 3D matrices as well as, biocompatibility *in vitro*, were studied. These data demonstrate that polyurethane-based 3D matrices produced by electrospinning could be used in construction of cardio-vascular implants.

Key words: polyurethane 3D matrices; electrospinning; biomechanical properties; biocompatibility.

Biocompatibility and stability of mechanical properties of the constructs in long-term perspective are the most prominent properties of the polymer designed for engineering of cardio-vascular implants. Polyurethanes (PU) have become perspective polymers for tissue engineering application, because they have good mechanical properties combined with biocompatibility and hemocompatibility. In present study were investigated properties of 3D matrices produced by electrospinning from Tecoflex EG-80A and Pellethane 2363-80A, which have aliphatic or aromatic diisocyanates as a hard segment, respectively.

Matrices were fabricated from solutions of 3-7% PU (% w/v) with 5÷20% gelatin (protein:PU, wt:wt %) in hexafluoro-2-propanol. The data obtained by scanning electron microscopy demonstrate that 3D matrices consisted of 1.12±0.44÷1.39±0.6 μm fibers with pore size of 3.6±1.3÷5.8±2.7 μm.

It was shown that the ratio of polyurethane and protein in the solution for electrospinning affects the mechanical properties of matrices. Tensile strength varied from 10.8 ± 0.3 MPa to 15.6 ± 1.8 MPa and from 8.1±1.2 MPa to 8.4±0.5 MPa for Tecoflex EG-80A-gelatin matrices and Pellethane 2363-80A-gelatin matrices, respectively, in depends from gelatin content. It was found that wetting of Tecoflex EG-80A-based matrices leads to 1.5 times reduction of a proportional limit and had no effects on mechanical properties of Pellethane 2363-80A-based matrices.

Scanning electron microscopy demonstrated that incubation of matrices in PBS at 37°C for 30 days interfere with structure of fibers, but had no effect on the tensile strength of Tecoflex EG-80A 3D matrices. It was shown that protein release is responsible for changes of 3D matrices microstructure.

Biocompatibility of PU-based matrices *in vitro* was studied using human umbilical vein endothelial cells. The data obtained demonstrate that cells effectively adhere and proliferate on matrices from Tecoflex EG-80A as compared with the scaffolds based on Pellethane 2363-80A. Fluorescence microscopy did not demonstrate any alterations of morphology of cells cultivated on 3D matrices as compared with cells on the culture plastic.

Thus, PU-based scaffolds containing gelatin can be used for producing of 3D matrices for tissue engineering with high strength, elasticity and biocompatibility of tissue engineering constructs.

УДК 615.457.5

ВКЛЮЧЕНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В МИКРОСФЕРЫ ВАТЕРИТА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Уварова В.И.[1], **Биневский П.В.** [1], **Балабушевич Н.Г.** [1], **Володькин Д.В.** [1,2]

[1]*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991, Ленинские Горы, 1, Москва, Россия*
[2] *Университет Ноттингем Трент, Ноттингем, NG11 8NS, Великобритания*
e-mail: uvarova_viktoriya@bk.ru

Исследовано включение супероксиддисмутазы в микросферы $CaCO_3$. Показана необходимость присутствия трис-буфера и глицерина для получения пористых микросфер ватерита и сохранения активности фермента. Изучено высвобождение супероксиддисмутазы из микросфер в физиологических условиях. Полученные препараты могут быть перспективными для лечения воспалительных заболеваний глаз.

Ключевые слова: микрокапсулирование; контролируемое высвобождение; карбонат кальция; супероксиддисмутаза; пролонгированное высвобождение.

Наиболее распространенным методом лечения глазных болезней является капельное введение лекарственных препаратов, однако при этом только 1-5% активного вещества проходит через эпителий роговицы, остальное же удаляется слезной жидкостью. Повышение концентрации лекарств увеличивает риск возникновения побочных эффектов. Использование инвазивных способов доставки является дорогостоящим и болезненным, возникает необходимость в повторных инъекциях или замене имплантатов. Иммобилизация лекарственных препаратов в нано- и микрообъекты позволяет достичь контролируемого высвобождения и пролонгации действия при местном капельном введении. При этом особое внимание уделяется отсутствию токсичности, биосовместимости и биодеградируемости носителей.

Кристаллы ватеритной модификации $CaCO_3$ активно используются в качестве матриц (включая полиэлектролитные частицы) при капсулировании биологически активных веществ. Легко синтезируемые в мягких условиях, высокопористые и биосовместимые частицы ватерита необходимого размера являются привлекательными в качестве контейнеров для загрузки и контролируемого высвобождения белков [1]. Тем не менее, механизмы включения и высвобождения белков в микросферы карбоната кальция недостаточно изучены. Целью данной работы было включение в микросферы ватерита супероксиддисмутазы-1 (СОД) – фермента (32 кДа, pI 4,5), используемого в офтальмологии для лечения воспалительных заболеваний [2].

Микросферы ватерита получали по стандартной методике сливанием растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3 [3], а СОД включали методом соосаждения. Для характеристики размера и морфологии частиц использовали электронную сканирующую и конфокальную микроскопию, а также рентгенофазовый анализ. Присутствие СОД не влияло на фазовый состав кристаллов.

Поскольку формирование ватерита в водном растворе происходит при pH 10 – 11, а СОД при высоких значениях pH среды теряет активность, при получении микросфер для понижения pH среды до 8,0–8,2 использовали 0,1 М трис-буфер (pH 7,5). Однако формирование $CaCO_3$ в буфере приводило к росту содержания более стабильного кальцита, не имеющего пористой структуры, необходимой для загрузки высокомолекулярных веществ. К тому же, после лиофильного высушивания фермент терял большую часть активности. Для сохранения высокого содержания ватерита и стабилизации СОД при сушке в среду получения добавляли 20 % глицерина. Исследована изотерма адсорбции СОД в выбранных условиях и рассчитаны термодинамические параметры этого процесса. Эффективность включения СОД в микросферы составила 78-97 % в зависимости от начальной концентрации белка (6-0,5 мг/мл). После растворения в ЭДТА сформированных микросфер диаметром 2 мкм фермент сохранял 48 % активности.

Кинетика высвобождения СОД зависит от начальной концентрации белка. Профиль высвобождения фермента не гладкий и демонстрирует всплеск (до 30% белка выделяется за первые 10 мин) с последующим медленным высвобождением (плато достигается в течение 100-200 мин, ~ 70 % белка высвобождается). Чем выше изначальная концентрация СОД при формировании кристаллов, тем ниже относительная ско-

рость высвобождения. При этом в течение суток наблюдается постепенный выход белка из частиц вплоть до полного высвобождения препарата за счет перекристаллизации ватерита в более стабильный кальцит.

Таким образом, получены и охарактеризованы ватеритные микросферы, содержащие активную СОД, которые можно рекомендовать для дальнейших исследований возможного применения препарата при терапии воспалительных заболеваний в офтальмологии.

Литература:
1. *Schmidt S., Volodkin D. Microparticulate biomolecules by mild $CaCO_3$ templating// J. Mater Chem. B. 2013. Vol. 1. P. 1210-1218.*
2. *Yasui K., Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation// Inflammation research. 2006. Vol. 9. № 55. P. 359-363.*
3. *Balabushevich N.G., Lopez de Guerenu A.V., Feoktistova N.A., Volodkin D.V. Protein-containing multilayer capsules by templating on mesoporous $CaCO_3$ Particles: POST- and PRE-loading approaches//* Macromolecular Bioscience. *2016. Vol. 16. P. 95-105.*

UDC 615.457.5

INCLUSION OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN VATERITE MICROSPHERES FOR OPHTHALMOLOGY USE

Uvarova V.I. 1, Balabushevich N.G. 1, Binevski P.V. 1, Volodkin D.V. 1,2

[1]Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
11999, Moscow, Leninskiye gory, 1
[2]Nottingham Trent University, Nottingham, NG11 8NS, Nottingham, United Kingdom
e-mail: uvarova_viktoriya@bk.ru

The inclusion of superoxide dismutase into microspheres of $CaCO_3$ is investigated. The need of the presence of Tris-buffer and glycerol in order to produce the porous vaterite microspheres keeping residual enzyme activity. The release of superoxide dismutase from the microspheres at physiological conditions is investigated. The obtained particles may be promising for the treatment of eye inflammatory diseases.

Key words: microencapsulation; controlled release; calcium carbonate; superoxide dismutase; sustained release.

The most common and simple method of treatment of eye diseases is an introduction of drugwater solutions into the eye. However, only 1-5% of the active compound passes through the cornea epithelium, while the rest is removed by lachrymal fluid. The increase of the drug concentration results in the risk of side effects. The use of invasive methods of drug delivery (injection, operation) is quite costly and painful, there is a need for additional injections or implants replacement. Immobilization of drugs in nano- and micro-carriers allows to achieve the controlled and prolonged release for direct administration of the carrier suspensions. In this case, special attention is paid to toxicity, biocompatibility, and biodegradability of these carriers.

Nowadays, the porous vaterite crystals of $CaCO_3$ are one of the most popular matrices used to encapsulate bioactive molecules. Indeed, the crystals are themselves very attractive containers for protein loading and controlled release due to their biocompatibility, high protein capacity, and soft and easy preparation conditions [1]. However, the mechanism of protein loading into and release out the crystals is still poorly understood. In this study we synthetized porous $CaCO_3$ microcrystals containing the enzyme superoxide dismutase-1 (SOD, 32 kDa, pI 4.5), which is used in ophthalmology for eye inflammation treatment [2].

The co-synthesis method [3] (SOD is added during crystal growth in water or in buffer with pH 7.5) was employed to encapsulate the SOD into the microspheres. A number of modern techniques have been employed to characterize the loaded crystals including confocal laser scanning and electron microscopies, as well as X-ray. SOD does not affect the phase composition of the crystals.

Since the formation of vaterite in aqueous solution takes place at pH 10 - 11 and SOD loses its activity at high pH values, 0.1 M Tris buffer (pH 7.5) was used in the preparation of the microspheres to reduce pH down to 8.0 - 8.2. However, the formation of $CaCO_3$ in the buffer resulted in enrichment of calcite, which does not have porous structure for loading of high molecular weight compounds. In addition, after freeze-drying the enzyme lost most of its activity. To maintain a high concentration of vaterite and to stabilize SOD upon drying, 20% of glycerol was added during the formation particles. The adsorption isotherm of SOD and the thermodynamic parameters of the process at selected conditions were studied. Encapsulation efficient of SOD into the crystals was found to be in the range

78-97% at initial protein concentration in the range 6-0.5 mg/ml, respectively. The enzyme keeps rather high residual activity (48%) after dissolution of the protein-containing microspheres (~2 μm in diameter) in EDTA.

The SOD release kinetics depends on SOD concentration used for the protein encapsulation into the $CaCO_3$ crystals. The release profile is dual demonstrating a burst (up to about 30% of protein release for first 10 min) followed by sustained release (shows a plateau reached within 100-200 min when about 70% of protein is released). The higher SOD concentration during encapsulation into the $CaCO_3$ crystals, the slower rate of the sustained release. The protein is completely released from the particles after one day of incubation due to recrystallization of the vaterite to non-porous calcite.

As a result, we obtained and characterized $CaCO_3$ microspheres containing high molecular weight drug (SOD). The spheres can be used for further studies i for treatment of the eye inflammatory diseases.

References:
1. *Schmidt S., Volodkin D. Microparticulate biomolecules by mild $CaCO_3$ templating// J. Mater Chem. B. 2013. Vol. 1. P. 1210-1218.*
2. *Yasui K., Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation// Inflammation research. 2006. Vol. 9. № 55. P. 359-363.*
3. *Balabushevich N.G., Lopez de Guerenu A.V., Feoktistova N.A., Volodkin D.V. Protein-containing multilayer capsules by templating on mesoporous CaCO3 Particles: POST- and PRE-loading approaches// Macromolecular Bioscience. 2016. Vol. 16. P. 95-105.*

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК: 57.087.1+577.218+576.5

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПЕРВИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ МАТРИКСОВ ИЗГОТОВЛЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА.

Степанова А.О., Лактионов П.П.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Институт патологии кровообращения им. ак. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, ул. ак. Лаврентьева 8
e-mail: lebedeva@niboch.nsc.ru

Методом секвенирования на платформе HiSeq 2500 исследован профиль экспрессии генов первичных эндотелиоцитов человека, культивированных на поверхности разных 3Д матриксов. Матриксы были изготовленных методом электроспиннинга из растворов поликапролактона (ПКЛ) с белком или без белка в гексафторизопропаноле. Получены данные о влиянии состава 3Д матрикса на экспрессию генов и функциональный статус клеток.

Ключевые слова: электроспиннинг, эндотелиоциты, РНК секвенирование.

Тканевая инженерия сосудов подразумевает разработку матриксов на поверхности которых эндотелиоциты могут сформировать функциональный монослой. Известно, что эффективность адгезии и скорость пролиферации эндотелиоцитов на поверхности 3Д матриксов зависит от состава и структуры его поверхности [1, 2]. В связи с этим, было оценено влияние состава 3Д матриксов на профиль экспрессии генов первичных эндотелиоцитов человека в экспериментах in vitro.

Методом электроспиннинга были изготовлены микроволокнистые 3Д матриксы из растворов чистого поликапролактона (ПКЛ) в гексафторизопропаноле, а также растворов ПКЛ с желатином, которые были выборочно обработаны глутаровым альдегидом. На поверхности таких матриксов культивировали первичные эндотелиоциты человека, полученные из пупочной вены человека. Для профилирования экспрессии генов использовали первичные эндотелиоциты двух биологических доноров. Из культивированных клеток были подготовлены образцы РНК, подготовлены библиотеки для секвенирования и выполнено секвенирование мРНК библиотек в центре биотехнологии и секвенирования

г. Турку (Финляндия).

Было получено не менее 10^7 прочтений для каждой из библиотек. С использованием двух платформ R/Bioconductor и Galaxy project полученные последовательности были выровнены на геном, нормализованы между образцами, определены дифференциально экспрессируемые гены. Данные о корреляции между образцами (>0,96) демонстрируют высокое качество выполненных экспериментов и возможность использовать полученные данные для расширенного биоинформационного анализа. Функциональный анализ выполняли с использованием базы данных Gene Ontology.

По данным функционального анализа было обнаружено, что наибольшее влияние материал подложки оказывает на экспрессию генов, участвующих в реализации механизмов связывания с белками и нуклеиновыми кислотами, каталитическую активность ферментов, активность структурных молекул, цитоскелета и регуляцию клеточного цикла. По данным дифференциального анализа функциональный статус эндотелиоцитов, культивированных на поверхности ПКЛ с желатином, обработанным ГА, наиболее близок к статусу клеток, культивируемых на поверхности культурального пластика.

Литература:
1. *Chung T.W., Liu D.Z., Wang S.Y., Wang S.S. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale// Biomaterials 2003. Vol. 24. № 25. P. 4655–4661.*
2. *Lamichhane S., Anderson J.A., Remund T., Sun H., Larson M.K., Kelly P., Mani G., Responses of endothelial cells, smooth muscle cells, and platelets dependent on the surface topography of polytetrafluoroethylene//J Biomed Mater Res Part A 2016. Vol. 104A. P. 2291–2304.*

UDC: 57.087.1+577.218+576.5

STUDY OF GENE EXPRESSION PROFILE OF PRIMARY ENDOTHELIAL CELLS CULTURED ON ELECRTOSPUN PRODUCED 3D MATRICES

Stepanova A.O., Laktionov P.P.

Institute of chemical biology and fundamental medicine SB RAS, Novosibirsk research institute of circulation pathology of academician E.N. Meshalkin, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Russia, Lavrent'ev ave., 8
e-mail: lebedeva@niboch.nsc.ru

Using mRNA sequencing on HiSeq 2500 the profile of gene expression of primary human endothelial cells cultured on various 3D matrices was investigated. Electrospun matrices were fabricated from solutions of polycaprolactone (PCL) in hexafluoroisopropanol with or without protein. The obtained data demonstrate strong influence of 3D matrix composition on a gene expression and functional state of the cells.

Key words: electrospinning, endothelial cells, RNA sequencing.

Tissue engineering of vascular grafts suggest development of 3D matrices providing formation of functional monolayer of endothelial cells on their surface. It is known that the effectiveness of the adhesion and proliferation rate of endothelial cells on the surface of 3D matrices depends on the composition of scaffold and surface structure [1, 2]. In this regards, the effect of 3D scaffolds composition on gene expression profile of human primary endothelial cells was studied by mRNA sequencing on HiSeq 2500 platform.

3D electrospun produced matrices were manufactured from solutions of pure polycaprolactone (PCL) in hexafluoroisopropanol and PCL solutions with gelatin, some of the matrices have been treated with glutaraldehyde (GA). Primary endothelial cells derived from human umbilical vein were cultured on the surface of scaffolds. Primary endothelial cells obtained from two biological donors were used to test effect of the 3D matrices on gene expression profile. RNA samples were prepared from cells cultured on different matrices, mRNA libraries and sequencing were done as offered by Illumina in the center of biotechnology and sequencing of Turku (Finland).

No less than 10^7 reads for each of library were obtained. mRNAseq data were aligned to genome, normalized between samples and assessed to differentially expressed genes using two platforms R/Bioconductor and Galaxy project. The correlation between samples (>0.96) demonstrates high quality of the experimental design and possibility to use data for bioinformatics analysis. Functional analysis was performed using Gene Ontology database.

According to the functional analysis, 3D matrices composition influence greatly on the expression of genes involved in the mechanisms of binding with proteins and nucleic acids, enzymes, catalytic activity, the activity of the structural molecules of the cytoskeleton and the regulation of the cell cycle. Differential analysis showed that the

functional state of endotheliocytes cultured on PCL-gelatin 3D matrices treated with GA is close to the status of the cells cultured on the culture dishes.

References:
1. *Chung T.W., Liu D.Z., Wang S.Y., Wang S.S. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale// Biomaterials 2003. Vol. 24. № 25. P. 4655–4661.*
2. *Lamichhane S., Anderson J.A., Remund T., Sun H., Larson M.K., Kelly P., Mani G., Responses of endothelial cells, smooth muscle cells, and platelets dependent on the surface topography of polytetrafluoroethylene//J Biomed Mater Res Part A 2016. Vol. 104A. P. 2291–2304.*

УДК 615.281.9

МИКРОЧАСТИЦЫ ГИДРОКСИПРОПИЛМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ - ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ НОВЫХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия, 119991 Ленинские горы 1, 3.
email i.m.deygen@gmail.com

Методом СКФ-микронизации получены микрочастицы гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), загруженные клинически значимыми антибиотиками фторхинолонового ряда. Охарактеризован физико-химические свойства частиц, определена эффективность влючения препаратов, изучены фармакокинетические параметры.

Ключевые слова: фторхинолоны, СКФ, туберкулез

Фторхинолоны - перспективный класс антибиотиков, широко используемый в терапии туберкулеза. Несмотря на высокую противотуберкулезную активность применение фторхинолонов до сих пор ограничено в виду малой растворимости в воде и низкой биодоступности. Образование комплексов с различными полимерами предоставляет широкий спектр возможностей для получения систем доставки с заданными свойствами, включая активное нацеливание.

В литературе описаны два основных пути получения подобных комплексов: смешивание растворов и перетирание порошков -, которые несмотря на методическую простоту, отличаются невысокой эффективностью включения препарата (до 20%) и подразумевают использование токсичных органических растворителей. Мы рассматриваем группу методов получения микрочастиц комплексов, основанных на технологии СКФ, как перспективную альтернативу указанным выше методам.

В данной работе мы получали комплексы включения моксифлоксацина, фторхинолона 3 поколения, с ГПМЦ, варьируя соотношение компонентов и параметров СКФ-установки (скорость потока, растворители). С целью придания системе эффекта активного нацеливания получали частицы, содержащие 5 - 10% маннозы, которая является растпространенной адресной меткой в пульмонологии. Все полученные частицы характеризовались методом DLS: средний диаметр частиц в растворе составлял 20 нм, в то время как исходная субстанция моксифлоксацина характеризуется средним диаметром более 200 нм. Методом ИК-спектроскопии Фурье в режиме НПВО исследован механизм комплексообразования, установлены основные сайты связывания и показана роль гидрофобных взаимодействий, причем введение маннозы в систему не отражается на процессе комплексообразования. Полученные данные подтверждены результатами флуоресцентной спектроскопии и СЭМ. Высвобождение моксифлоксацина исследовано методом равновесного диализа с флуоресцентным детектированием моксифлоксацина. Исследованы in vivo фармакокинетические параметры на лабораторных крысах, определены AUC, клиренс и C max.

Работа выполнена при поддержке РНФ 15-13-00063

UDC 615.281.9

HYDROXIPROPYLMETHYLCELLULOSE – PERSPECTIVE POLYMER FOR NEW ANTI-TUBERCULOSIS DRUG FORLUMATIONS

Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E.V.

Department of chemistry Lomonosov MSU, Moscow, Russia, 11991 Leninskie gory 1, 3.
email i.m.deygen@gmail.com

Microparticles of clinically significant antibiotic fluoroquinolonemoxifloxacin and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) were obtained via SCF technology. We have characterized its physicochemical properties of the particles, efficiency of loading and pharmacokinetic parameters.

Key words: fluoroquinolones, SCF, tuberculosis.

Fluoroquinolons are perspective anti-tuberculosis antibiotics, which are widely used in current therapy. However due to low bioavailability and poor solubility in water their application is still limited. Formation of complexes with various polymers provides a great opportunity to obtain new drug formulations with enhanced efficacy and variable properties, including active targeting.

In literature two main ways to obtain complexes are described: direct mixing of solution or kneading of powders. These ways despite their simplicity are characterized with some drawbacks including low efficiency of drug inclusion and application of toxic organic solvents. We consider supercritical fluid technology as a perspective new way allowing formation of inclusion complex fluoroquinolons – polymer.

In this work we deal with the fluoroquinilone of the third generation moxifloxacin proven to be effective in tuberculosis treatment and hydroxypropylmethylcellulose as a biocompatible polymer. In order to obtain enhanced uptake in vivo we have produced complex particles containing mannose, which is a well known as an active targeting additive for pulmonology.

Obtained particles we have characterized by DLS: average diameter is 20 nm, while in water moxifloxacin forms aggregates more than 200 nm. ATR-FTIR spectroscopy: complex formation is proven by changes in spectral adsorption area of quinolone fragment and of carboxyl group. These changes include typical shifts of bands as well as changes in intensities caused by changes of microenvironment of functional groups. Addition of mannose doesn't influence on complex formation. Obtained data on complex structure were complimented by data of fluorescence analysis and SEM. Drug release was studied by fluorescence via dialysis procedure; we have studied pharmacokinetic on rats and AUC, clearance and C max were evaluated.

This work is supported by RSF 15-13-00063

.....

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

.....

УДК: 615.461-77:577.11:621.31

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ПРОТИВОСПАЕЧНЫХ МЕМБРАН ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ НА ПЕРЕДНЮЮ ПОВЕРХНОСТЬ СЕРДЦА

Кудрявцева Ю.А., Шишкова Д.К., Насонова М.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г.Кемерово, Россия
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6,
E-mail: kudrua@kemcardio.ru

Сравнение мембран на основе полигидроксибутировалерата с поли(лактид-ко-гликолидом)), и коллагеновых мембран (КолГАРА) показало отсутсвие системной специфической воспалительной реакции, что свидетельствует об их высокой биосовместимости.

Ключевые слова: спайки, противоспаечные мембраны, биодеградируемые полимеры, полигидроксибутировалерат, поли(лактид-ко-гликолид), КолГАРА.

В кардиохирургии нередко проводятся многоэтапные хирургические вмешательства, при этом важную роль играет профилактика образования послеоперационных спаек. Применение биодеградируемых противоспаечных мембран может позволить предотвратить спаечный процесс, являющийся причиной массивного кровотечения, которое удлиняет время повторной операции, а также увеличивает частоту послеоперационных осложнений и летальность.

Биодеградируемые противоспаечные мембраны на основе полигидроксибутировалерата (PHBV) с поли(лактид-ко-гликолидом) (PLGA) с включением дексаметазона (ДМ) при имплантации способствуют равномерному выделению препарата в окружающие ткани, что снижает воспалительную реакцию, уменьшает риск образования спаек.

Цель работы – оценить реакцию организма на ортотопическую имплантацию противоспаечных мембран.

Материалы и методы. Для изготовления мембран использовали PHBV (330 кДа) (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, г. Пущино) и PLGA (Лаборатория биополимеров и биотехнологии ТГУ, г. Томск) в соотношении полилактида к полигликолиду 60:40. В качестве группы сравнения была взята коллагеновая мембрана КолГАРА (Синтаколл ГмбХ, Германия). Мембраны изготавливали на установке для электроспиннинга Nanon-01A (MECC Inc., Япония). Экспериментальные образцы противоспаечных мембран были представлены следующими группами: PHBV+PLGA, PHBV+PLGA+ДМ (концентрация ДМ составила 0,5 мг/мл), КолГАРА. Для включения ДМ в состав мембраны использовали коаксиальную насадку. Образцы мембран (n = 28) размером 0,7×0,7 см имплантировали крысам-самцам линии Wistar весом 300-350 г. Контрольноя группа 1 - ложнооперированные животные (группа ЛО, n = 12), которым в аналогичных условиях выполнялись все манипуляции за исключением подшивания матриксов. Контрольноя группа 2 - здоровые интактные животные (n = 5). Вывод животных из эксперимента через 2 недели, 1 и 2 месяца. У всех животных забиралась кровь с целью последующего определения провоспалительных цитокинов посредством ИФА. Сердце с фиксированной на нем мембраной биоптировали для гистологического изучения с окраской гематоксилин-эозином и по Ван Гизон.

При гистологическом анализе через 2 недели имплантации в группах PHBV+PLGA, PHBV+PLGA+ДМ отмечали признаки начальной дезорганизации мембраны в виде разволокнения. КолГАРА сохраняла свою целостность, признаки биодеструкции отсутствовали. Местами отмечался очаговый кардиосклероз. Между эпикардом и мембраной визуализировался слабо выраженный спаечный процесс. Во всех группах образцов визуализировалась толстая соединительно-тканная капсула (СТК) с формированием узкого макрофагального барьера на границе капсулы импланта.

Микроскопический анализ удаленных образцов через 1 месяц показал, что образцы с ДМ подверглись значительной резорбции в части противоположной эпикарду. На стороне прилегающей к эпикарду не отмечено нарушений целостности мембраны и СТК. На эпикарде слабая лимфоцитарная инфильтрация, слабое трансмуральное воспаление. В образцах без ДМ отмечена выраженная очаговая лимфоцитарная инфильтрация, в зоне имплантации миокардиосклероз, мембрана подверглась незначительной резорбции. Образцы КолГАРА - умеренная лейкоцитарная инфильтрация перикарда, в зоне имплантации миокардиосклероз. В мембране лимфоцитарная инфильтрация, СТК тонкая, отмечена значительная деструкция образца мембраны во всех направлениях.

Через 2 месяца имплантации воспалительная реакция уменьшалась, отмечено более слабое соединение мембран с эпикардом во всех группах. КолГАРА слоистого строения, без воспаления, миокардиоциты обычного строения. У мембран с ДМ клеток воспалительного ряда не отмечено, толщина СТК вокруг мембран уменьшалась. Образцы мембран без ДМ сохраняют свою целостность, СТК плотная и толстая, по сравнению со всеми исследуемыми группами.

Статистически значимых различий в сывороточных концентрациях провоспалительных цитокинов между экспериментальным группами обнаружено не было.

Таким образом, более выраженная воспалительная реакция на всем периоде наблюдения отмечалась при имплантации мембран без ДМ, мембраны с ДМ продемонстрировали в ходе эксперимента минимальный воспалительный ответ и наименьшие сроки биодеградации. Показано, что включение лекарственного вещества в состав противоспаечной мембраны позволяет эффективно снижать местную воспалительную реакцию и интенсивность спайкообразования.

UDC: 615.461-77:577.11:621.31

ADHESION BARRIERS OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)/POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) ARE EQUALLY BIOCOMPATIBLE TO COLLAGEN MEMBRANES IN A MODEL OF ORTHOTOPIC IN VIVO IMPLANTATION

Kudryavtseva Y.A., Shishkova D.K., Nasonova M.V.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Sosnovy Boulevard 6, Kemerovo, 650002, Russian Federation
E-mail: kudrua@kemcardio.ru

Both poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(lactide-co-glycolide) and collagen adhesion barriers did not cause systemic inflammation, therefore demonstrating high biocompatiblity.

Key words: adhesions, adhesion barriers, biodegradable polymers, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), poly(lactide-co-glycolide), collagen.

Postoperative adhesions still remain an unresolved problem in cardiac surgery. They cause massive bleedings requiring a repeated surgery, hence being a cause of significant morbidity and even mortality. Biodegradable adhesion barriers applicable during the primary surgery were suggested as a promising prevention option.

Aim: to assess tissue and systemic response to orthotopic implantation of adhesion barriers.

Materials and Methods. For the fabrication of adhesion barriers, we utilized poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV, 330 kDa, provided by Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Puschino) and poly(lactide-co-glycolide) (PLGA, provided by Laboratory of Biopolymers and Biotechnology, Tomsk State University, Tomsk) in a 3:2 ratio. As a comparison group, we used commercially available collagen membranes (Syntacoll), since collagen is a natural polymer. Adhesion barriers were prepared by electrospinning (Nanon-01A, MECC), with optional incorporation of dexamethasone (0.5 mg/mL) employing a coaxial nozzle. Adhesion barriers (n = 27) with a 0.7×0.7 cm area were implanted into male Wistar rats (one per each rat) weighing 300-350 g. Sham-operated rats (n = 12) and intact rats (n = 5) were considered as control groups. All animals were sacrificed either 2 weeks, 1, or 2 months postimplantation (one-third of rats per each time point), with a subsequent explantation of the heart with adhesion barrier and collection of serum. Histological examination was performed using hematoxylin and eosin and van Gieson stainings whereas levels of pro-inflammatory cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

At all the time points, we detected neither tissue nor systemic inflammation in all groups. No significant differences in serum levels of pro-inflammatory cytokines were found. Therefore, adhesion barriers fabricated of biodegradable synthetic polymers are equally biocompatible to those prepared from collagen, a natural polymer. This can be applied in the development of the adhesion barriers for cardiac surgery.

.....

УДК 621.793

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОПОКРЫТИЙ КОРОНАРНЫХ СТЕНТОВ НА КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОЙ БАЛАНС

Бойцова Е.Л., Леонова Л.А.

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.
e-mail: boi5@list.ru

Экспериментально установлено, что биосовместимые оксинитридные покрытия TiON не оказывают влияния на pH жидкостей организма вследствие их низкой растворимости.

Ключевые слова: биосовместимые покрытия, реактивное магнетронное распыление, водородный показатель pH, кислотно-щелочной баланс.

Известно [1], что некоторые покрытия имплантатов, растворяясь в среде организма, вносят изменения в качественный и количественный состав окружающих тканей и физиологических жидкостей. Водородный показатель pH является одним из определяющих факторов, характеризующих происходящие биологические и химические процессы.

Объектом нашего исследования являются образцы TiON-плёнок, осажденных методом реактивного магнетронного распыления на пластины из кристалла NaCl (10×10×1 мм) [2]. Целью данной работы являлось изучение потенциального изменения pH при растворении оксинитридного покрытия титана в физиологическом растворе NaCl (0,9%).

Для этого исследуемые образцы TiON покрытий выдерживались в течение 300 суток в NaCl (0,9%). Химический состав раствора регулярно контролировался [2]. Определено, что с течением времени TiON-плёнки практически не растворяются, а элементы O и N не смещают баланс в щелочную сторону (из-за вымывания избытка углекислоты из крови и/или образования аммиака [3]) или в кислотную сторону (вероятнее при образовании оксидов азота), как это предполагалось ранее. Таким образом, основные жизненные среды (кровь, лимфа, слюна, межклеточная и спинномозговая жидкости), как и физиологический раствор NaCl (0,9%) при контакте с TiON-покрытием имеют слабощелочную реакцию (pH=7,4).

Литература:
1. *Hofman S.H., van Beusekom H.M., Serruys P.W., van der Giessen W.J. Recent developments in coated stents. Curr. Intervent. Cardiol. Rep. 2001. Vol. 3. P. 28-36.*
2. *Leonova L.A., Boytsova E.L., Pustovalova A.A. The study of titanium oxynitride coatings solubility deposited by reactive magnetron sputtering// IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2016. Vol. 135 (1) [012026, 5 p.]*
3. *Физиология. «Основы функциональные системы. Курс лекций» /Под ред. К.В. Судакова – М.: Медицина, 2000.*

УДК 621.793

STUDY OF CHEMICAL PROPERTIES BIOCOVERS CORONARY STENTS ON THE ACID-BASE BALANCE

Boytsova E.L., Leonova L.A.

Tomsk Polytechnic University, Lenina 30, Tomsk, 634050, Russia.
E-mail: boi5@list.ru

It was established experimentally that the biocompatible coating oxynitride TiON no influence on the pH of the body fluids due to their low solubility.

Key words: biocompatible coatings, reactive magnetron sputtering, the pH, acid-base balance.

It is known [1] that some of the coating of implants, dissolving in the medium of the body, make changes to the qualitative and quantitative composition of the surrounding tissues and body fluids. The pH is one of the determining factors that characterize the ongoing biological and chemical processes.

The object of our study are samples TION-films deposited by reactive magnetron sputtering on a plate of crystal NaCl (10 × 10 × 1 mm) [2]. The aim of this work was to study potential changes in pH when dissolved oxynitride coating of titanium in saline NaCl (0,9%).

For this TiON coatings investigated samples were kept for 300 days in NaCl (0,9%). The chemical composition of the solution regularly monitored [2]. It was determined that over time TiON-film practically does not dissolve, and the elements O and N are not displace the balance in the alkaline side (due to leaching of excess carbon dioxide from the blood and / or formation of ammonia [3]) or to the acid side (which is expected during the formation nitrogen oxides), as previously thought. Thus, the basic living environment (blood, lymph, saliva, and cerebrospinal fluid, intercellular) as saline solution NaCl (0,9%) in contact with TiON-coated have slightly alkaline reaction (pH = 7.4).

References:
1. *Hofman S.H., van Beusekom H.M., Serruys P.W., van der Giessen W.J. Recent developments in coated stents. Curr. Intervent. Cardiol. Rep. 2001. Vol. 3. P. 28-36.*
2. *Leonova L.A., Boytsova E.L., Pustovalova A.A. The study of titanium oxynitride coatings solubility deposited by reac-*

tive magnetron sputtering// IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2016. Vol. 135 (1) [012026, 5 p.]
3. Physiology. "Fundamentals of functional systems. The course of lectures "/ Ed. KV Sudakova - M .: Medicine, 2000.

УДК 61.615.4; 61.615.26

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИСЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В ОТНОШЕНИИ STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

О.А. Легонькова[1], Р.П. Терехова[1], Т.А.Ушакова[1], А.И. Коротаева[1], А.А. Алексеев[1], М.А. Теплоногова[2], А.Е. Баранчиков[3], В.К. Иванов[3]

[1] ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России,
Москва, 117997, ул. Большая Серпуховская, д. 27,
e-mail: Legonkova@ixv.ru.
[2] Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1.
[3] ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова» РАН, Москва, 119991, Ленинский пр-кт, 31.

Проведены исследования по оценке антимикробной активности известных в клинической практике антисептических средств в присутствии нанодисперсного диоксида церия с целью определения возможности разработки покрытий для лечения хирургических ран.

Ключевые слова: нанодисперсный диоксид церия (НДЦ), антимикробная активность, антисептик, Лавасепт, Хлоргексидин, Доксидин, Мирамистин, катионные поверхностно-активные соединения, Staphylococcus epidermidis.

Нанокристаллический диоксид церия (НДЦ) является перспективным материалом для биомедицинского применения [1, 2]. Преимущества его использования определяются двумя основными факторами: высокой кислородной нестехиометрией и низкой токсичностью. Первый фактор обусловливает участие НДЦ в протекании редокс-процессов в живой клетке, особенно в условиях окислительного стресса. Второй обеспечивает сравнительную безопасность применения наночастиц диоксида церия in vivo. К специфическим свойствам НДЦ следует отнести также способность к регенерации кислородной нестехиометрии, которая выражается в том, что наночастицы диоксида церия после участия в окислительно-восстановительном процессе за сравнительно небольшой промежуток времени способны возвращаться к исходному состоянию, что обеспечивает их пролонгированное действие in situ.

В связи с этим актуальным является изучение влияния нанодисперсного диоксида церия на антимикробную активность антисептических средств, широко применяемых в клинической практике, с целью разработки комплексного медицинского изделия.

Объектами исследования являлись растворы нанодисперсного диоксида церия (НДЦ), как стабилизированные цитратом аммония (далее по тексту – С/НДЦ), так и не содержащие дополнительных стабилизаторов. Серия антисептиков представлена следующими препаратами в промышленно выпускаемых концентрациях и уже широко используемых в лечебной практике: Лавасепт (0,2 %); Хлоргексидин (0,02 %); Диоксидин (1 %); Мирамистин (0,01 %); а также катионные поверхностно-активные вещества, четвертично-аммониевые соединения. Препараты для исследований готовились в соотношениях антисептик:НДЦ (стабилизированный и нестабилизированный) равных 1:1 и 1:2, соответственно.

Результаты исследований показали, что, как в случае стабилизированного НДЦ, так и в случае нестабилизированного препарата уменьшение концентрации антисептиков практически не влияет на их антимикробную активность в отношении Staphylococcus epidermidis.

Зоны задержки роста тест-культуры практически одинаковые как при исходных концентрациях антисептических средств, так и при их разведении в 2 раза в случае Лавасепта, Хлоргексидина, Мирамистина, при этом сохраняется удовлетворительный показатель чувствительности – зона задержки составляет 15 – 25 мм.

Устойчивое сохранение и даже некоторое увеличение антимикробной активности наблюдалось в случае присутствия нестабилизированного и стабилизированного НДЦ лишь у антисептиков, содержащих в своей структуре лабильные атомы хлора - четвертично-аммониевых полимерных галогенидов.

Золь С/НДЦ характеризуется отрицательным значением ζ-потенциала (– 21 мВ), золь Н/НДЦ – положительным (около + 30 мВ). Отрицательный заряд поверхности золя С/НДЦ может способствовать лучшей сорбции на поверхности наночастиц биологически активных органических катионов Hal № 1, Hal № 2, высвобождая активные ионы хлора. Однако, в случае изучения системы Н/НДЦ:галогениды также наблюдалось увеличение антимикробной активности, что позволяет сделать вывод о наличии симбиотической активности смеси НДЦ:четвертично-аммониевые полимерные галогениды вне зависимости от кислотности среды, размера частиц диоксида церия, способов получения исходных растворов диоксида церия.

Таким образом, растворы нанодисперсного диоксида церия могут быть сочетаны с любыми антисептиками без подавления их антимикробной активности.

Литература:

1. А.Б. Щербаков, В.К. Иванов, Н.М. Жолобак, О.С. Иванова, А.Е. Баранчиков, Е.Ю. Крысанов, Н.Я. Спивак, Ю.Д. Третьяков. Нанокристаллический диоксид церия – перспективный материал для биомедицинского применения // Биофизика. 2011. Т. 56. № 2. С. 995 – 1015.

2.N.M. Zholobak, V.K. Ivanov, A.B. Shcherbakov. Interaction of nanoceria with microorganisms. In Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy (Ed. A. Grumezescu), William Andrew Publishing, 2016, P. 419 – 450.

UDC 61.615.4; 61.615.26

INVESTIGATION OF ANTISEPTICS' ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

O.A. Legonkova[1], R.P. Terehova[1], T.A.Ushakova[1], A.I. Korotaeva[1], A.A. Alekseev[1], M.A. Teplonogova[2], A.E. Baranchikov[3], V.K. Ivanov[3]

[1] State Organization «Institute of Surgery named after A.V. Vishnevsky», Russian Ministry of Health, Moscow, 117997, B. Serpukhovskaya, 27.
e-mail: Legonkova@ixv.ru
[2] Moscow State University named after M.V. Lomonosov
Moscow, 119991, Lenin Hills, 1
[3] Institute of General and Inorganic Chemistry named after N.S. Kurnakov RAS,
Moscow 119991, Leninsky Prospect, 31

The researches on assessment of antiseptics' antimicrobial activity (widely known and used in clinical practice) in presence of nanodisperse cerium dioxide for the purposes of definition the possibility of dressings' elaboration for treatment of surgical wounds were carried out.

Key words: nanodispersed cerium dioxide (NCD), antimicrobial activity, antiseptic, Lavasept, Chlorhexidine, Dioksidin, Miramistin, cationic surfactants, Staphylococcus epidermidis.

Nanocrystalline cerium dioxide (NCD) is a promising material for biomedical applications [1, 2]. Advantages of NCD application are determined by two main factors: high oxygen non-stoichiometry and low toxicity. The first factor determines participation of NCD in redox processes of living cells, particularly under oxidative stress conditions. The second factor provides comparative safety use of cerium dioxide nanoparticles *in vivo*. Regenerative ability of oxygen non-stoichiometry is specific propertiy of NCD. It means that NCD nanoparticles after participation in redox processes in a relatively short period of time are able to return into its original state, which ensures prolonged action *in situ.*

Thereby the study of NCDs'influence on antiseptics'antimicrobial activity is important with the purposes of elaboration of integrated medical devices.

The objects of study were nanodispersed cerium dioxide (NCD) solutions, which were stabilized by ammonium citrate. The other part of nanodispersed cerium dioxide solutions were without additional stabilizers. Series of antiseptics were presented by the following preparations (commercially available) with concentrations widely used in medical practice: Lavasept (0.2%); Chlorhexidine (0.02%); Dioksidin (1.0%); Miramistin (0.01%); and cationic surfactants, quaternary ammonium compounds. Preparations for studies were prepared in ratios of antiseptic: NCD (stabilized and unstabilized) equal to 1:1 and 1:2, respectively.

The results showed that, in the cases of stabilized and unstabilized NCD, antiseptic' concentration practically didn't change its antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis*.

Test cultures'zones of growth retardation practically were the same at starting concentrations of antiseptics,

and Lavasept, Chlorhexidine, Miramistine dilution in 2 times, wherein sensitivity index was satisfactory - the growth retardation was about 15 - 25 mm.

Stable preservation and even a slight increase of antiseptics'antimicrobial activity were observed in presence of unstabilized and stabilized NCD. These antiseptics contained a labile chlorine atoms in its structure - polymeric quaternary ammonium halides.

Stabilized sol of NCD is characterized by a negative value of z-potential (- 21 mV), unstabilized sol of NCD has a positive value of z-potential (appr. + 30 mV). Negative surface charge of sol can contribute to better adsorption on surface of nanoparticles of biologically active organic cations of quaternary ammonium compounds releasing active chlorine ions. However, in the system unstabilized NCD:halides increase of antimicrobial activity was also observed, which allowed to make a conclusion about symbiotic activity of mixture NCD:quaternary ammonium polymer halides regardless of medium acidity, particle size of cerium dioxide, methods for preparing cerium initial solutions.

Thus, the solutions of nanodispersed cerium dioxide can be combined with any antiseptics without suppression of their antimicrobial activity.

References:
1. A.B. Shcherbakov, V.K. Ivanov, N.M. Zholobak, O.S. Ivanov, A.E. Baranchikov, E.J. Krysanov, N.Y. Spivak, Y.D. Tretyakov. Nanocrystalline cerium dioxide - a promising material for biomedical applications // Biophysics. 2011. T. 56. № 6. p. 995 - 1015.
2. N.M. Zholobak, V.K. Ivanov, A.B. Shcherbakov. Interaction of nanoceria with microorganisms. In Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy (Ed A. Grumezescu.), William Andrew Publishing, 2016, P. 419 - 450.

УДК 665.944.581; 613.55; 614.9

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЯНТАРНЫХ ЛАКОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ

Бамбура М.В.[1], Акопян В.Б.[1], Бондаренко Г.А.[2], Сорокин И.А.[3]

[1] Акционерное общество «Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ» 109004, Москва, ул. Александра Солженицына, 27
E-mail: Mariya-bambura@yandex.ru
[2] Общество с ограниченной ответственностью «Инжиниринговый центр «Зеленая химия» (ООО «ИЦ «Зеленая Химия»
[3] Акционерное общество «Техмашсервис»

Янтарный лак, полученный при ультразвуковой (УЗ) интенсификации, обладает бактериостатическим и фунгистатическим свойствами и имеет явные преимущества перед многими другими, используемыми в медицине, ветеринарии, биотехнологии защитными покрытиями.

Ключевые слова: янтарь, янтарный лак, бактериостатический эффект, фунгистатический эффект, защитное покрытие, ультразвук.

Лаки, полученные методом ускоренного растворения янтаря в органических растворителях, в интенсивном УЗ поле полностью сохраняют свойства натурального янтаря и проявляют высокие защитные свойства даже в агрессивных средах. Янтарные лаки при высыхании образуют прочную, тонкую, эластичную плёнку, безвредную для человека и животных. Эти лаки препятствуют росту и развитию грибов, бактерий, дрожжеподобных грибков и других, часто встречающихся на поверхностях различных биотехнологических конструкций и на внутренних поверхностях медицинских помещений. Использование низкочастотного УЗ с высокой плотностью мощности, приводит к значительному сокращению времени производства готового продукта, к гомогенизации готового лака и к более полному растворению янтаря. Экспериментально показана возможность применения янтарных лаков, как спиртовых, так и масляных, для защиты: - внутренних поверхностей биотехнологического оборудования от биокоррозии и обрастания биопленками; - от обрастания поверхностей съемных протезов, урологических катетеров и др. медицинских конструкций, контактирующих с биотканями; - ногтей; - копыт животных от воздействия высоко обсемененной жижи.

УДК 665.944.581; 613.55; 614.9

INTENSIFICATION THE PROCESS OF AMBER VARNISH PRODUCTION FOR USING IN BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

Bambura M.V.[1], Bondarenko G.A.[2], AkopyanV.B.[1], Sorokin I.A.[3]

[1] Joint-stock company «State Scientific Research Institute of Protein Biosynthesis»
[2] Company "Engineering Center" Green Chemistry "(JSC" IC "Green Chemistry")
[3] Joint-stock company «Tehmashservis»

Amber varnish obtained by ultrasonic intensification, possesses bacteriostatic and fungi-static properties and has clear advantages over many others, used in medicine, veterinary and biotechnology bacteriostatic coatings.

Key words: amber, amber varnish, bacteriostatic effect, fungistatic effect, protective coating, ultrasound.

Varnishes obtained by rapid dissolution of amber in organic solvents, in essential and drying oils under intensive ultrasonic treatment fully retain properties of natural amber and exhibit a high degree protective properties even in aggressive media.Amber varnish dries to form a solid, thin, elastic film, harmless to humans and animals. These coatings prevent the growth and development of fungi *Aspergillus spp*., *Penicillum spp., Trichoderma viride, Fusarium culmorum,* bacterial species Bacillus subtilis, yeast-like fungi *Candida albicans* and other microorganisms commonly encountered on the surfaces of various biotechnological constructions and on the inner surfaces of medical areas.Use of low-frequency ultrasound with high power density leads to a significant reduction in the time of the finished product production and to the more complete dissolution of amber.

The possibility was shown of using amber varnishes: - for protection of internal surfaces of biotechnological equipment against bio-corrosion and biofilms; - for protection from fouling the surfaces of dentures, urological catheters, and other medical devices which are in contact with biological tissues; - for protection of nails, preventing the formation of fungal formations; - for protection the animals' hooves during housing from the effect of high contaminated liquid manure.

.....

УДК 577.152.31

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ UREIBACILLUS THERMOSPHAERICUS, УСТОЙЧИВОЙ К ОРГАНИЧЕСКИМ РАСТВОРИТЕЛЯМ

Самойлова Ю.В.[1], Сорокина К.Н.[1,2], Пармон В.Н.[1,2]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д.5
e-mail: samoylova.jv@catalysis.ru

В данной работе была получена и охарактеризована термостабильная эстераза бактерии *U. thermosphaericus,* экспрессированная в *E. coli* BL21 (DE3). Изучены свойства эстеразы в отношении широкого диапазона значений температур и различных органических растворителей.

Ключевые слова: эстераза, термостабильность, метанол, биодизельное топливо.

Термостабильные эстеразы нашли широкое применение в современных технологических процессах, в том числе в химической промышленности, для получения биодизельного топлива и т.д. Ключевыми показателями, определяющими эффективность использования эстераз в промышленности, являются термостабильность и устойчивость по отношению к органическим растворителям, т.к. часто реакции протекают при высоких температурах (40-70°C) или в присутствии растворителей (например, метанола).

Эстераза термофильной бактерии *U. thermosphaericus* была экспрессирована в клетках *E. coli* BL21 (DE3) на основе вектора pET32b. Исследование свойств эстеразы выявило ее высокую термостабиль-

ность. Она сохраняла около 80 % от первоначальной активности после инкубации в течение 1 ч в диапазоне температур 40-90 °С и свыше 73 % - после 4 ч при температурах 50-70 °С. Также исследуемый фермент показал высокую стабильность в присутствии ряда органических растворителей, а именно н-гексана, ацетона, DMF, ацетонитрила и одноатомных спиртов – при инкубации в течение 1 ч при температуре 50 °С в данных растворителях эстераза сохраняла 100 % от первоначальной активности. Таким образом, полученные результаты говорят о перспективности применения термостабильной, устойчивой к влиянию растворителей, эстеразы estUT1 в составе биокатализаторов различных технологических процессов, например, реакции переэтерификации для получения биодизельного топлива.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-38-00425 мол_а.

УДК 577.152.31

PROPERTIES OF THERMOSTABLE AND ORGANIC SOLVENT TOLERANT ESTERASE FROM UREIBACILLUS THERMOSPHAERICUS

Samoylova Y.V.[1], Sorokina K.N.[1,2], Parmon V.N.[1,2]

[1] Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
e-mail: samoylova.jv@catalysis.ru

In this study, a thermostable esterase from *U. thermosphaericus* expressed in *E. coli* BL21 (DE3) was obtained and characterized. Its thermostability and resistance to various organic solvents were studied.

Key words: esterase, thermostability, methanol, biodiesel.

Thermostable esterases are widely used in modern industry, including chemical industry, biodiesel production, etc. The major factors that determine efficiency of their application in the industry are thermostability and resistance to organic solvents, as these reactions often take place at high temperatures (40-70 °C) or in the presence of solvents (for example, methanol).

The esterase from thermophilic bacteria U. thermosphaericus was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells, using pET32b as expression vector and showed high thermostability. It retained about 80 % residual activity after incubation for 1 h at the temperature 40-90 °C and over 73 % of residual activity for 4 h at 50-70 °C. It also demonstrated high stability in the presence of organic solvents, namely, n-hexane, acetone, DMF, acetonitrile and monohydric alcohols – it retained 100 % enzyme activity after incubation for 1 h at 50 °C. Thus, these results show prospects of application of thermostable and organic solvent tolerant esterase from U. thermosphaericus in various technologies, for example, in the reaction of transesterification to produce of biodiesel.

This work was supported by RFBR grant № 16-38-00425 mol_a.

УДК. 61.617—089;66.661.11

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТВЕРДЫХ ЭМБОЛОВ ДЛЯ ЗАКУПОРКИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

Асанова Л.Ю.[1], Белова М.С.[1], Жаворонок Е.С.[2], Легонькова О.А.[1]

[1] ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия
117997, г. Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27
e-mail: ospolimed@mail.ru
[2] Московский технологический университет (МИТХТ), Москва, Россия
119571, г. Москва, проспект Вернадского, д. 86

Проведены работы по формированию в водной среде твердых эмболов из биологически совместимых растворов полимеров. Разработаны подходы к изготовлению твердых образцов для испытаний на растяжение и сжатие, и изучены механические свойства. Показано, что предельная прочность на сжатие и растяжение эмболов, сформированных в водной среде, несколько уменьшается с увеличением времени выдерживания в воде и заметно увеличивается с ростом концентрации полимера в эмболизирующем рас-

творе. Все исследованные составы проявляют прочность, достаточную для того, чтобы не разрушаться под действием кровотока.

Ключевые слова: кровеносный сосуд, эмболизация, растворы полимеров, эмбол, прочность на растяжение, прочность на сжатие.

Ранее была выбрана оптимальная система полимер - растворитель для создания эмболизирующего состава, были изучены закономерности формирования эмболов в водной среде.

Настоящая работа выполнена в продолжение этого исследования и посвящена изучению механических свойств получаемых твердых эмболов, которые определяют возможность их длительного применения в кровеносных руслах.

Формирование в водной среде твердых полимерных эмболов из жидких биологически совместимых растворов и исследование их свойств представляют собой большой интерес для оценки практической применимости эмболизации путем научного подхода разделения фаз. При этом подготовка эмболоподобных образцов для исследований является достаточно сложной и нетривиальной задачей. В настоящей работе предложены новые способы подготовки таких образов и исследованы их прочностные свойства.

Эксперименты показали, что на малых временах (до 10 суток) выдерживания в воде сформированного эмбола происходит падение его прочности на сжатие (на 46,3 %) и прочности на растяжение (на 27,8 %) и составляют 0,31 ± 0,07 и 0,10 ± 0,03 МПа, соответственно. Эти значения сохраняются в этих же пределах в течение 6 месяцев. Наблюдалось увеличение кажущейся плотности в среднем на 9,4 %. Сразу после формирования эмбола уменьшение прочности связано с выходом основной массы растворителя (диметилсульфоксида с плотностью 1.10 г/см^3), который оказывает на полимер (с плотностью 1.28 г/см^3) пластифицирующее действие.

Абсолютное значение 50% прочности на сжатие составляет 0.31-0.67 МПа, а предельной прочности при растяжении – 0.10-0,36 МПа. Согласно Вицлебу [1], у большинства людей систолическое давление в кровеносных сосудах не превышает 150 мм рт.ст. – т.е. не более 0.02 МПа. Таким образом, материал всех исследованных эмболоподобных образцов должен выдержать напор потока крови, и ограничения на состав и концентрацию эмболизирующего раствора со стороны механических (прочностных) свойств готовых эмболов отсутствуют.

Результаты оценки жизнеспособности клеток ММСК с целью оценки влияния токсичности эмболизирующего состава и его компонентов, показали, что через 1,5 часа ни один из компонентов эмболизирующего состава и сами эмболы, полученные из растворов с разными исходными концентрациями, не токсичны. Со временем жизнеспособность клеток несколько снижается, оставаясь на уровне, позволяющем позиционировать разрабатываемые составы как нетоксичные.

Литература:
1. Вицлеб Э. Функции сосудистой системы/ в кн. Физиология человека, под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. Т.2. – М.: Мир. – 1996. – С.498-565.

.....

UDC. 61.617—089;66.661.11

MECHANICAL PROPERTIES OF SOLID EMBOLI TO BLOOD VESSELS BLOCKAGE, WHICH PREPARED IN AN AQUEOUS MEDIUM FROM POLYMER SOLUTIONS

Asanova L.Yu.[1], Belova M.S.[1], Zhavoronok E.S.[2] , Legonkova O.A.[1]

[1] *The Institute of Surgery named after A.V. Vishnevsky, Moscow, Russia*
117997, Moscow, Bolshaya Serpukhovskaya Street, 27
e-mail: ospolimed@mail.ru
[2] *Moscow Technical University (MITHT), Moscow, Russia*
119571, Moscow, Vernadsky prospect, 86

Work was carried out to form the solid emboli from biocompatible polymer solutions in an aqueous medium. Approaches to the production of solid samples for tensile and compression, and mechanical properties were studied. It was shown that the maximum compressive and tensile strength of emboli formed in the aqueous medium reduced with increasing time of exposure in water, and significantly increases with increasing polymer

concentration in the embolizing solution. All the investigated compounds exhibit sufficient strength in order not to collapse under the influence of the blood flow.

Key words: blood vessel, embolization, polymer solutions, embolus, tensile strength, compressive strength.

Previously, the optimum polymer - solvent system was chosen to create an embolic composition, laws of embolis' forming were studied in the aquatic environment.

This work was performed in the course of this study and is devoted to the investigation of the mechanical properties of the resulting solid emboli, that determine the possibility of long-term use in the bloodstream.

Formation in the aquatic environment of solid polymer emboli from fluid biocompatible solutions and studying their properties are of great interest to evaluate the practical applicability of embolization by scientific approach phase separation. This preparation of embolus' samples for research is quite complex and non-trivial task. In the present study novel methods for preparing such images were provided, and their mechanical properties were investigated.

Experiments showed, that at short times (up to 10 days) incubation in water of the formed embolus, takes place the decrease of its compressive strength (46.3%) and tensile strength (27.8%) and constitute 0.31 ± 0.07 and 0.10 ± 0.03 MPa, respectively. These values are stored in the same range for 6 months. Also, an increase in the average bulk density is 9.4%.

Immediately after the formation of embolus the decrease in strength is connected with the output of the main mass of solvent (dimethylsulfoxide with a density of 1.10 g/cm^3), which has plasticizing effect on the polymer (with a density of 1.28 g/cm^3).

The absolute value of 50% of the compressive strength is 0.31-0.67 MPa and the tensile strength - 0.10-0,36 MPa.

According Witzleb [1], systolic pressure of blood vessels of the majority of people does not exceed 150 mm Hg - not more than 0.02 MPa.

Thus the material of all investigated emboli samples should withstand the pressure of the blood flow, and restrictions on the composition and concentration of the solution by embolizing mechanical (strength) properties of the finished emboli absent.

Evaluation results of MSC cell viability to assess the effects of toxicity embolizing composition and its components, showed that after 1.5 hours, none of the components themselves and embolizing composition obtained from solutions with different initial concentrations are not toxic. Over time, cell viability decreases slightly, remaining at a level to position the developed formulations as non-toxic.

References:

1. *Witzleb E. Functions of the vascular system/in the book. Human Physiology, ed. P. Schmidt and G. Thews. V.2. - M .: Mir. - 1996. - p. 498-565.*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

СЕКЦИЯ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

SECTION

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 577.113.(7+4):547.327

НОВЫЕ АНАЛОГИ ДНК И РНК С МОДИФИЦИРОВАННОЙ ФОСФАТНОЙ ГРУППОЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

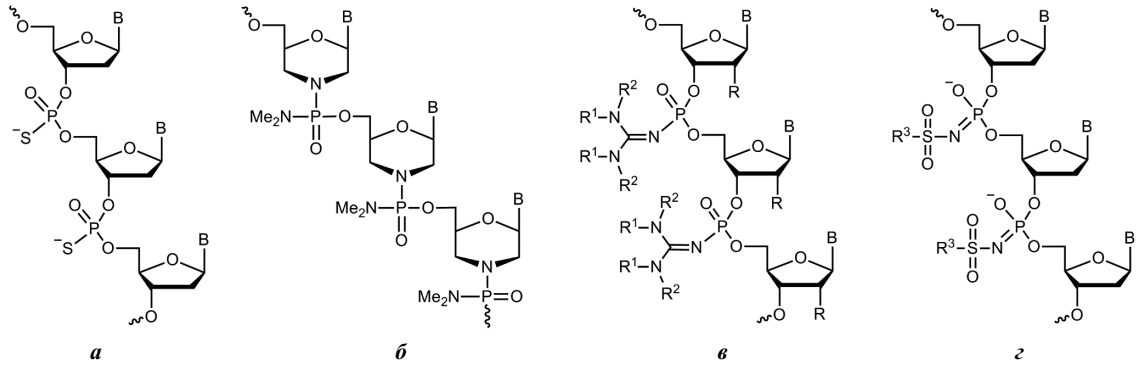
Челобанов Б.П., Фокина А.А., Прохорова Д.В., Захрямина А.Е., Ильина А.М., Клабенкова К.В., Левина А.С., Васильева С.В., Буракова Е.А., Стеценко Д.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8
dast@niboch.nsc.ru

Новые аналоги ДНК и РНК с модифицированными межнуклеотидными фосфатными группами были получены с помощью реакции Штаудингера на твердой фазе. Ряд соединений показал перспективные свойства для дальнейшего изучения как антисмысловые терапевтические препараты.

Ключевые слова: антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды, ген-направленные препараты, твердофазный синтез, реакция Штаудингера.

Аналоги ДНК и РНК широко исследуются как перспективные ген-направленные препараты для лечения рака, генетических болезней, инфекций, вызываемых вирусами или бактериями. В настоящее время уже применяются как терапевтические средства ДНК-тиофосфаты (рис. 1, *а*) и морфолиновые олигонуклеотиды (рис. 1, *б*).



а *б* *в* *г*

Рис. 1. *Аналоги нуклеиновых кислот с модифицированными межнуклеотидными фосфатными группами:* ***а****) ДНК-тиофосфаты (PS-олигонуклеотиды);* ***б****) фосфордиамидные морфолиновые олигонуклеотиды (PMO);* ***в****) фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО): R = H, OMe, F; $R^1 = R^2 = Me$ (Tmg); $R^1 = Me$, $R^2+R^2 = -(CH_2)_2-$ (Dmi); $R^1+R^2 = -(CH_2)_4-$ (Dpy);* ***г****) N-(сульфонил)-фосфорамидные олигонуклеотиды (СФО): $R^3 = Me$ (Msp), Bu^n (Bsp), **p**-C_6H_4Me (Tsp), **o**-$C_6H_4NO_2$ (Nsp).*

Недавно в ИХБФМ СО РАН были получены представители нового класса аналогов олигонуклеотидов, в которых межнуклеотидные фосфатные группы замещены фосфорилгуанидиновыми группами [1]. Фос-

форилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) (рис. 1, *в*) могут образовывать комплементарные комплексы с ДНК или РНК, обладающие устойчивостью, близкой к устойчивости комплексов природных олигонуклеотидов [2]. ФГО обладают высокой устойчивостью к действию нуклеаз [3, 4]. Нами показано, что ФГО с остовом на основе 2-О-метилрибозы (рис. 1, *в*, R = OMe) проявляют антисмысловую активность, не уступающую известным аналогам ДНК (рис.1, *а* и *б*).

В последнее время нами был получен ряд новых N-(сульфонил)-фосфорамидных олигонуклеотидов (рис. 1, *г*). Комплементарные комплексы, образуемые данными производными с ДНК или РНК, по своей устойчивости лишь незначительно уступают комплексам, образуемыми природными олигонуклеотидами [5].

Таким образом, полученные нами впервые аналоги ДНК и РНК могут послужить перспективной основой для создания терапевтических препаратов на основе нуклеиновых кислот.

При финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 15-03-06331, 15-04-04109, 15-29-01334, 16-03-01055). Синтез модифицированных олигонуклеотидов проводился за счет гранта РНФ № 15-15-00121.

Литература:

1. *Заявка на патент WO2016/028187A1, 22.08.2014.*
2. *Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот // Acta Naturae. – 2014. – Т. 6. – № 4. – С. 123-125.*
3. *Lebedeva N.A., Anarbaev R.O., Kupryushkin M.S., Rechkunova N.I., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A., Lavrik O.I. Design of a new fluorescent oligonucleotide-based assay for a highly specific real-time detection of apurinic/apyrimidinic site cleavage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // Bioconjugate Chem. 2015. Vol. 26. № 10. P. 2046-2053.*
4. *Kuznetsov N.A., Kupryushkin M.S., Abramova N.V., Kuznetsova A.A., Miroshnikova A.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S. New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // Mol. BioSyst. 2016. Vol. 12, № 1. P. 67-75.*
5. *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. Химия. – 2017. – Т. 43. – № 1. – С. 45-50.*

УДК 577.113.(7+4):547.327

NEW DNA AND RNA ANALOGUES WITH MODIFIED PHOSPHATE GROUP AS PROSPECTIVE THERAPEUTIC AGENTS

Chelobanov B. P., Fokina A. A., Prokhorova D. V., Zakhryamina A. E., Ilyina A. M., Klabenkova K. V., Levina A. S., Vasilyeva S. V., Burakova E. A., Stetsenko D. A.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8
dast@niboch.nsc.ru

New DNA and RNA analogues with modified internucleotide phosphate groups have been obtained via Staudinger reaction on solid phase. Several of the compounds have shown promise as antisense therapeutics.

Key words: antisense oligonucleotide therapeutics, cellular delivery, solid-phase synthesis, Staudinger reaction.

DNA and RNA analogues are widely investigated as promising gene-targeting agents to treat cancer, genetic diseases and viral or bacterial infections. Some of them such as DNA phosphorothioates (Fig. 1, *a*) and morpholino oligonucleotides (Fig. 1, *b*) are currently being used as therapeutics.

Recently, representatives of a new class of oligonucleotide analogues with internucleotide phosphate groups replaced by phosphoryl guanidine groups have been synthesized in ICBFM SB RAS [1]. Phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO) (Fig. 1, *c*) can form complementary complexes with DNA or RNA, which have stability close to that of natural oligonucleotide complexes [2]. PGO have demonstrated high resistance to nucleases [3, 4]. We have shown that PGO with the backbone based on 2-O-methylribose (Fig. 1, *c*, R = OMe) exhibit antisense activity that is similar to known DNA analogues (Fig. 1, *a* and *b*).

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

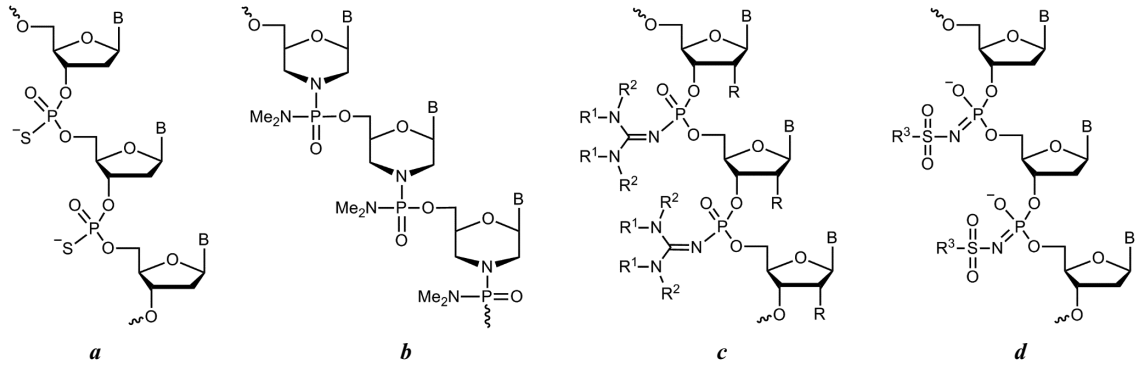


Fig. 1. *Nucleic acid analogues with modified internucleotide linkages: **a**) DNA phosphorothioates (PS-oligonucleotides); **b**) phosphordiamidate morpholino oligonucleotides (PMO); **c**) phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO): R = H, OMe, F; $R^1 = R^2 = Me$ (Tmg); $R^1 = Me$, $R^2+R^2 = -(CH_2)_2-$ (Dmi); $R^1+R^2 = -(CH_2)_4-$ (Dpy); **d**) N-sulfonyl phosphoramidate oligonucleotides (SPO): $R^3 = Me$ (Msp), Bu^n (Bsp), **p**-C_6H_4Me (Tsp), **o**-$C_6H_4NO_2$ (Nsp).*

Very recently we have prepared several new N-(sulfonyl)-phosphoramidate oligonucleotides (Fig. 1, *d*). Stability of complementary complexes formed by these derivatives with DNA or RNA is only marginally inferior to the complexes formed by the natural oligonucleotides [5].

Thus, we have obtained for the first time several DNA and RNA analogues, which may serve as a promising platform for design of nucleic acid therapeutics.

Authors acknowledge financial support from RFBR (grants №№ 15-03-06331, 15-04-04109, 15-29-01334, 16-03-01055). Synthesis of modified oligonucleotides have been supported by RSF grant № 15-15-00121.

References:
1. Patent application WO2016/028187A1, 22.08.2014.
2. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. Phosphoryl guanidines. A new type of nucleic acid analogues // Acta Naturae. 2014. Vol. 6. № 4. P. 116-118.
3. Lebedeva N.A., Anarbaev R.O., Kupryushkin M.S., Rechkunova N.I., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A., Lavrik O.I. Design of a new fluorescent oligonucleotide-based assay for a highly specific real-time detection of apurinic/apyrimidinic site cleavage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // Bioconjugate Chem. 2015. Vol. 26. № 10. P. 2046-2053.
4. Kuznetsov N.A., Kupryushkin M.S., Abramova N.V., Kuznetsova A.A., Miroshnikova A.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S. New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // Mol. BioSyst. 2016. Vol. 12, № 1. P. 67-75.
5. 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. – № 1. – P. 39-43.
УДК 544.77 (075.8)

.....

УДК 547.1-32-304.2

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Власов В. В. , Зенкова М. А., Пышный Д. В., Стеценко Д.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Россия
630090 Новосибирск, проспект Лаврентьева 8
email: vvv@niboch.nsc.ru

Развитие методов синтетической биологии и накопленные знания о генетических программах ответственных за развитие заболеваний открыли возможность создания интеллектуальных ген-направленных препаратов для лечения широкого спектра заболеваний.

Ключевые слова: терапевтические олигонуклеотиды, генотерапия

Антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы и малые интерферирующие РНК могут подавлять экспрессию целевых генов в клетках млекопитающих и несколько олигонуклеотидных препаратов уже одобрены для применения в клинике. Разработка улучшенных вариантов олигонуклеотидных конъюгатов, способных проникать в определенные клетки млекопитающих и клетки бактерий откроет

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

возможность создания широкого спектра препаратов для лечения различных болезней вызванных аномальным функционированием измененных генетических программ, таких, как рак, и болезнями, вызываемыми инфекционными агентами, которые имеют собственные генетические программы.

Аптамеры, способные связываться со специфическими белками, оказались способными подавлять функционирование целевых белков в клетках in vivo. Идентифицированы противовирусные и противоопухолевые препараты на основе ДНК-олигонуклеотидов и двуцепочечных РНК. Системы направленного воздействия на ДНК CRISPR – Cas9 открыли возможность коррекции генетических программ в клетках в культуре и in vivo. Эти системы найдут применение в целом ряде медицинских технологий, таких, как коррекция генетических дефектов, введение новых программ в клеточный геном и инактивация вирусных геномов, встроившихся в клеточные генетические программы. Успехи в области создания препаратов на основе нуклеиновых кислот будут определяться развитием химии нуклеиновых кислот, необходимой для синтеза новых аналогов олигонуклеотидов и развитием подходов к направленной доставке нуклеиновых кислот в определенные виды клеток, к их молекулярным мишеням.

.....

UDC 547.1-32-304.2

THERAPEUTIC NUCLEIC ACIDS

Vlassov V.V., Zenkova M.F., Pyshnii D. V., Stetsenko D.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
630090 Novosibirsk, Lavrentiev Avenue 8,
email: vvv@niboch.nsc.ru

Development of methods of synthetic biology and identification of genetic programs responsible for development of diseases, provided possibilities for development of smart gene- targeted therapeutics capable of specific silencing of unwanted genes expressionand correction of mutated genetic programs.

Key words: therapeutic oligonucleotides, gene therapy.

Antisense oligonucleotides, ribozymes and siRNAs can arrest expression of target genes in mammalian cells and several oligonucleotide therapeutics have been approved for use in clinics. Design of improved versions of modified oligonucleotide conjugates capable of entering into bacterial cells and into specific mammalian cells will open possibilities for development of a broad range of therapeutics for treatment of different diseases caused by inappropriate functions of cellular genetic programs, such as cancer, and diseases caused by infectious agents, having their own unique genetic programs.

Aptamers, capable of binding to specific proteins, proved to be potential therapeutics, capable of interfering with functions of the target proteins in vivo. Recent development of the CRISPR – Cas9 system for manipulating DNA opened possibilities for correction of genetic programs in cells in culture and in vivo. This system and stem cell technologies provide a broad range of potential applications in therapy, such as correction of genetic defects, introduction of new programs in the cell genome and inactivation of viral genomes inserted in cellular genetic programs.

Success in the field of design of nucleic acid based therapeutics will be determined by development of chemistry of nucleic acids, needed for synthesis of appropriate oligonucleotide analogs and by development of techniques providing possibilities for efficient targeting specific cells and deliver nucleic acid therapeutics into cells, to their targets.

.....

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

ДИСТАНЦИОННО УПРАВЛЯЕМАЯ ДОСТАВКА МИКРО- И НАНОСИСТЕМ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Горин Д.А.[1], **Сухоруков Г.Б.**[1,2]

[1]*Саратовский национальный исследовательский университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия 410012, Саратов, Астраханская, 83*
[2]*Queen Mary, University of London, Mile End Road, London, E1 4NS, UK*

Микро и наносистемы из биодеградируемых полимеров, содержащих неорганические частицы, были успешно получены методом полиионной сборки. Чувствительность наноструктурированных систем к внешним воздействиям зависит от объемной фракции неорганических частиц. Это может использоваться для создания нового поколения систем доставки лекарств, комбинирующих навигацию, визуализацию и дистанционно активированное высвобождение биоактивных веществ *in vivo*.

Ключевые слова: полимерные и нанокомпозитные микрокапсулы, неорганические наночастицы, МРТ и фотоакустическая визуализация, ультразвуковое воздействие, дистанционное высвобождение лекарств.

Современная медицина нуждается в новом типе систем доставки лекарств, которые будут сочетать функции *in vivo* навигации, визуализации с возможностью обеспечить управляемое биораспределение лекарства, включающее внешний контроль и детекцию важнейших биологических маркеров [1]. Это сложное сочетание можно реализовать с помощью создания мультифункциональных носителей. Существует несколько подходов, позволяющих создавать полимерные носители. Это и полимеризация эмульсий [2] и метод полиионной сборки [3] и т.д. Достоинство метода полиионной сборки для создания систем доставки лекарств по сравнению с другими методами является перестраиваемая структура и химический состав на наноуровне и как результат возможность создавать микрокапсулы чувствительные к внешним воздействиям. Тип биоактивных веществ и внешнее воздействие для дистанционного высвобождения зависит от биораспределения капсул, которые контролируются способом in vivo введения. Химический подход к адресной доставки с использованием поверхностной модификации не работает эффективно *in vivo* вследствии эффекта опсонизации [4]. Таким образом, физическая адресация систем доставки лекарств более многообещающий подход. Это может быть реализовано с помощью градиента магнитного поля [5], оптического пинцета [6]. Продемонстрированно, что чувствительность капсул и структур ядро-оболочка к таким внешним воздействиям, как лазерное излучение, ультразвук может изменятся варьированием объемной фракции и химического состава неорганических наночастиц в оболочке полиэлектролит/наночастицы [5,7]. Подобный подход применяется для визуализации носителей лекарств с помощью МРТ [8], ОКТ [9] и фотоакустический метод [10], используя наночастицы магнетита и золота, как контрастные объекты, соответственно.

Полученные композитные микро- и наносистемы могут быть использованы для создания систем доставки лекарств, комбинирующих такие функциональности, как навигация, визуализации, *in vivo* мониторинга биохимических процессов, активированному дистанционно высвобождению биоактивных веществ in vivo с помощью ультразвука.

Работа выполнена при поддержки правительства РФ (грант №14.Z50.31.0004 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования) и Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

Литература:

1. *Stetciura I. Y. et al. Nanoencapsulated and microencapsulated SERS platforms for biomedical analysis //Current opinion in pharmacology. – 2014. – Т. 18. – С. 149-158.*
2. *Landfester K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles //Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – Т. 48. – №. 25. – С. 4488-4507.*
3. *Sukhorukov G. B. et al. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles //Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects. – 1998. – Т. 137. – №. 1. – С. 253-266.*
4. *Kreyling W. G. et al. In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles //Nature nanotechnology. – 2015. – Т. 10. – №. 7. – С. 619-623..*
5. *Gorin D. A. et al. Magnetic/gold nanoparticle functionalized biocompatible microcapsules with sensitivity to laser irradiation //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2008. – Т. 10. – №. 45. – С. 6899-6905.*
6. *Stetciura I. Y. et al. Composite SERS-based satellites navigated by optical tweezers for single cell analysis //Analyst. – 2015. – Т. 140. – №. 15. – С. 4981-4986.*

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

7. Korolovych V. F. et al. Impact of high-frequency ultrasound on nanocomposite microcapsules: in silico and in situ visualization //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2016. – T. 18. – №. 4. – C. 2389-2397.
8. German S. V. et al. In vitro and in vivo MRI visualization of nanocomposite biodegradable microcapsules with tunable contrast //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2016. – T. 18. – №. 47. – C. 32238-32246.
9. Genina E. A. et al. In vivo optical monitoring of transcutaneous delivery of calcium carbonate microcontainers // Biomedical Optics Express. – 2016. – T. 7. – №. 6. – C. 2082-2087.
10 Yashchenok A. M. et al. Multifunctional polyelectrolyte microcapsules as a contrast agent for photoacoustic imaging in blood //Journal of biophotonics. – 2016. – T. 9. – №.8. – C. 792–799.

REMOTE CONTROLLABLE DELIVERY MICRO- AND NANOSYSTEMS LOADED BY DRUGS

Dmitry A. Gorin[1], Gleb B. Sukhorukov[1,2]

[1]Saratov State University, 83 Astrachaskaya Str., Saratov, 410012, Russia
[2]Queen Mary, University of London, Mile End Road, London, E1 4NS, UK

The micro- and nanosystems made of biodegradable polymers containing inorganic nanoparticles with tunable physical properties were successfully prepared using layer-by-layer approach. Sensitivity of nanostructured systems to external influences depends on volume fraction of inorganic nanoparticles. It can be used for creation of new generation of drug delivery systems combined navigation, visualization and, remote activated release of bioactive substances in vivo.

Key words: polymer and nanocomposite microcapsules, inorganic nanoparticles, MRI and photoacoustic visualization, photoacoustic imaging, ultrasound treatment, remote drug release.

The modern medicine requires the new type of drug delivery carriers that will combine functions of in vivo navigation and visualization, ability to deploy drug in controllable manner, including external triggering and sensing of important biological markers [1]. This complex combination can be realized by fabrication of multifunctional carriers. There are several approaches for polymeric drug delivery carrier fabrication. There are emulsion polymerization [2], layer-by-layer assembly method [3] etc. Advantage of layer-by-layer assembly for drug delivery systems in comparison with other methods is tunable structure and chemical composition at nanoscale level and as results allow fabrication of microcapsules with sensitivity to external influences. The type of bioactive substance and external effect for release action depends on microcapsule biodistribution that can be controlled by type changing of in vivo administration. Realization for chemical targeted delivery based on surface modification are not working well in vivo due to the corona effect [4]. Thus physical targeting of drug delivery is more promising approach. It can be realized by gradient of magnetic field [5], optical tweezers approach [6]. It was demonstrated that the sensitivity of capsule and core-shell to external influences as laser irradiation, ultrasound treatment can be changed by variation of volume fraction and chemical composition of inorganic nanoparticles in the polyelectrolyte/nanoparticle shell [5,7]. Same approach is applied for drug carrier visualization by MRI [8], OCT [9] and photoacoustic method [10] using magnetite and gold nanoparticles as contrast agents, respectively.

Obtained micro- and nanosystems can be used for creation of drug delivery systems including drug depot, combined much functionality as navigation and visualization, in vivo monitoring of biochemical process, remote activated release of bioactive substances in vivo by ultrasound.

The work was supported by Government of the Russian Federation (grant №14.Z50.31.0004 to support scientific research projects implemented under the supervision of leading scientists at Russian institutions and Russian institutions of higher education) and Saratov State University.

References:

1. Stetciura I. Y. et al. Nanoencapsulated and microencapsulated SERS platforms for biomedical analysis //Current opinion in pharmacology. – 2014. – T. 18. – C. 149-158.
2.Landfester K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles //Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – T. 48. – №. 25. – C. 4488-4507.
3.Sukhorukov G. B. et al. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles //Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects. – 1998. – T. 137. – №. 1. – C. 253-266.
4.Kreyling W. G. et al. In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles //Nature nanotechnology. – 2015. – T. 10. – №. 7. – C. 619-623..
5.Gorin D. A. et al. Magnetic/gold nanoparticle functionalized biocompatible microcapsules with sensitivity to laser irradiation //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2008. – T. 10. – №. 45. – C. 6899-6905.
6.Stetciura I. Y. et al. Composite SERS-based satellites navigated by optical tweezers for single cell analysis //Analyst.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

– 2015. – Т. 140. – №. 15. – С. 4981-4986.
7. *Korolovych V. F. et al. Impact of high-frequency ultrasound on nanocomposite microcapsules: in silico and in situ visualization //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2016. – Т. 18. – №. 4. – С. 2389-2397.*
8. *German S. V. et al. In vitro and in vivo MRI visualization of nanocomposite biodegradable microcapsules with tunable contrast //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2016. – Т. 18. – №. 47. – С. 32238-32246.*
9. *Genina E. A. et al. In vivo optical monitoring of transcutaneous delivery of calcium carbonate microcontainers // Biomedical Optics Express. – 2016. – Т. 7. – №. 6. – С. 2082-2087.*
10. *Yashchenok A. M. et al. Multifunctional polyelectrolyte microcapsules as a contrast agent for photoacoustic imaging in blood //Journal of biophotonics. – 2016. – Т. 9. – №.8. – С. 792–799.*

УДК 577.114.7:577.352.2:616-006

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ С ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОЛЕКАРСТВАМИ

Водовозова Е.Л., Онищенко Н.Р., Алексеева А.С., Третьякова Д.С., Болдырев И.А., Молотковский Ю.Г.

ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: elvod@lipids.ibch.ru

Противоопухолевый эффект 100-нм липосом из природных фосфолипидов и липофильных пролекарств мелфалана и метотрексата показан на моделях лимфолейкозов, рака молочной железы и рака легких. Установлено селективное действие липосом, несущих углеводный лиганд селектинов, на эндотелиальные клетки, активированные ФНО-альфа.

Ключевые слова: наноразмерные липосомы; рак; липофильные пролекарства; мелфалан; метотрексат; направленная доставка; SiaLe^x; гемосовместимость.

Липосомы как системы доставки лекарств занимают лидирующую позицию в области наномедицины благодаря присущей им био- и гемосовместимости. Они пригодны для внутривенного введения, что особенно важно в химиотерапии онкологических заболеваний. Однако разнообразие липосомальных препаратов невелико, так как инкапсулировать в наноразмерные липосомы терапевтически эффективное количество водорастворимой субстанции можно лишь методом активной загрузки — диффузией лекарств во внутренний объем липосом против градиентов концентраций ряда солей с образованием гель-кристаллической фазы. Этот процесс реализуем только для амфифильных слабых кислот или оснований, в том числе для доксорубицина и других антрациклиновых антибиотиков. «Золотым стандартом» наномедицины признан препарат Doxil®. Другой подход к загрузке эффективной концентрации лекарства в липосомы — включение субстанций в липидный бислой в виде липофильных конъюгатов. Это упрощает технологию производства липосомальных препаратов и улучшает их фармакологические свойства. После поглощения клеткой-мишенью пролекарства расщепляются эндогенными ферментами с высвобождением исходного лекарства. Нами разработаны 100-нм-липосомы на основе яичного фосфатидилхолина и фосфатидилинозита из сои или *S. cerevisiae* и липофильных пролекарств алкилирующего агента мелфалана (Mlph) и антиметаболита метотрексата (MTX) [1,2]. В докладе рассмотрены принципы построения молекул липофильных пролекарств, способ получения препаратов липосом длительного хранения. Показана эффективность предлагаемого подхода на примерах улучшения терапевтических свойств лекарств на моделях экспериментальных животных с раком молочных желез [3], раком легких [4], лимфолейкозами [5]. С целью увеличения селективности действия (таргетная терапия) получены липосомы, несущие молекулярный адрес углеводной природы (тетрасахарид SiaLe^x) для доставки к ангиогенному эндотелию опухоли. Показан антиваскулярный эффект цитотоксических SiaLe^x-липосом, который приводил к усилению торможения роста карциномы легкого Льюис, по сравнению с лечением липосомами без адреса. Визуализировано связывание SiaLe^x-липосом с микрососудами опухоли и накопление безадресных липосом в опухолевой ткани за счет экстравазации [4]. Установлено селективное действие SiaLe^x-липосом на эндотелиальные клетки, активированные ФНО-альфа [6]. Показано, что препараты липосом, в том числе, с SiaLe^x-лигандом, не влияют на основные форменные элементы крови [7].

UDC 577.114.7:577.352.2:616-006

ANTITUMOR LIPOSOMES LOADED WITH LIPOPHILIC PRODRUGS

Vodovozova E.L., Alekseeva A.S., Onishchenko N.R., Tretiakova D.S., Boldyrev I.A., Molotkovsky J.G.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia
117997, Moscow, Ul. Miklukho-Maklaya 16/10
e-mail: elvod@lipids.ibch.ru

The 100-nm liposomes formed from natural phospholipids and lipophilic prodrugs of melphalan and methotrexate showed efficacy in the mouse models of mammary cancer, breast cancer, and leucosis. The selective effect of liposomes equipped with carbohydrate selectin ligand on the TNF-α activated endothelial cells was established.

Key words: nanosized liposomes; tumors; lipophilic prodrugs; melphalan; methotrexate; drug targeting; SiaLe^x; hemotolerance.

Liposomal drug delivery systems are leaders in nanomedicine due to inherent bio- and hemocompatibility. They suit for the intravenous administration so essential for the chemotherapy of malignancies. Yet the spectrum of liposomal drugs in the market is not diverse. Remote loading is the only technique allowing for encapsulation therapeutically effective quantity of a water-soluble substance in a nano-sized liposome. However, the method based on diffusion of a drug in the liposome interior against a concentration gradient of some salts with following formation of a gel-crystalline phase is realizable only for weak amphipathic acids or bases, including doxorubicin and other anthracycline antibiotics. Doxil™ is the gold standard of a nanomedicine. Another approach to the production of liposomes relevantly loaded with a pharmacon is to include a drug in the lipid bilayer in the form of lipid conjugate that is lipophilic prodrug. The latter one, after uptake by the target cell, undergoes hydrolysis by endogenous enzymes with the release of initial drug. The production of such liposomal formulations is simplified, and pharmacological properties of preparations improve as well. We have developed 100-nm-liposomes composed of egg phosphatidylcholine, phosphatidylinositol from soybean or baker's yeast and lipophilic prodrugs of alkylating agent melphalan (Mlph), and antimetabolite methotrexate (MTX) [1, 2]. In the report, molecular structures of lipophilic prodrugs, and the principle of liposome production for long-term storage are considered. Our liposomes showed efficacy in the mouse models of mammary cancer [3], breast cancer [4], and leucosis [5]. To achieve targeting of angiogenic tumor endothelium, we prepared liposomes bearing tetrasaccharide SiaLe^x (a selectin ligand). In the Lewis lung carcinoma model, SiaLe^x-Mlph-liposomes showed antivascular effect and increase of tumor growth inhibition as compared with SiaLe^x–free liposomes. Both binding of SiaLe^x-liposomes with tumor microvessels and extravasation of SiaLe^x-free liposomes in tumor tissue were visualized [4]. The selectivity of SiaLe^x-liposomes towards TNF-α activated endothelial cells was established [6]. Our liposomal formulations including those ones with SiaLe^x-ligand revealed hemotolerance: they do not disturb main blood cells [7].

References:

1. *Vodovozova E.L., Kuznetsova N.R., Kadykov V.A., Khutsyan S.S., Gaenko G.P., Molotkovsky Y.G. Liposomes as nanocarriers of lipid-conjugated antitumor drugs melphalan and methotrexate // Nanotechnol. Russia. – 2008. – Vol. 3. P. 228-239.*
2. *Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I., Kadykov V., Gaenko G., Molotkovsky J., Vodovozova E. Liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan as convenient drug delivery vehicles // J. Drug Deliv. Sci. Technol. – 2009. – Vol. 19. № 1. P. 51-59.*
3. *Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. Antitumour activity of cytotoxic liposomes equipped with selectin ligand SiaLeX, in a mouse mammary adenocarcinoma model // Eur. J. Cancer. – 2000. – Vol. 36. № 7. P. 942-949.*
4. *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 Targeting. – 2014. – Vol. 22. № 3. P. 242-250.*
5. *Alekseeva A., Moiseeva E., Onishchenko N., Boldyrev I., Singin A., Budko A., Shprakh Z., Molotkovsky J., Vodovozova E. Liposomal formulation of a methotrexate lipophilic prodrug: assessment in tumor cells and mouse T-cell leukemic lymphoma. // Int. J. Pharm. 2017 in press.*
6. *Alekseeva A., Kapkaeva M., Shcheglovitova O., Boldyrev I., Pazynina G., Bovin N., Vodovozova E. Interactions of antitumour Sialyl Lewis X-liposomes with vascular endothelial cells. // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – Vol. 1848. P. 1099-1110.*
7. *Kuznetsova N.R., Sevrin C., Lespineux D., Bovin N.V., Vodovozova E.L., Mészáros T., Szebeni J., Grandfils C. Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer. // J. Control. Release. – 2012. – Vol. 160. P. 394-400.*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОМЫ

И.В. Чехонин[1], Д.И. Жигарев, М.Т. Зангиева, О.И. Гурина

ФГБНУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава Российской Федерации
[1] e-mail: Ivan-Chekhonin@yandex.ru

В последние годы активная иммунотерапия низкодифференцированных глиом на основе сенсибилизированных («пульсированных») опухолевыми антигенами дендритных клеток привлекает значительное внимание как нейробиологов, так и клиницистов.

Для получения иммуногенных дендритных клеток *in vitro* из гемопоэтических предшественников предложено несколько схем, в которых для сенсибилизации используются различные антигенные смеси.

Особенностью данного исследования стало получение сенсибилизированных антигенами тканевого экстракта крысиной глиомы С6 дендритных клеток крысы, зрелость которых была подтверждена морфологическим, цитофлуориметрическим и функциональным методами. Имеющийся в нашем арсенале набор антител к нейроспецифическим и глиома-ассоциированным антигенам (GFAP, коннексин-43, BSAT1, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2) позволил оценить количественную представленность данных белков в использованном нами тканевом экстракте крысиной глиомы С6. Полученные результаты, с одной стороны, позволяют предположить целесообразность модификации антигенного состава тканевого экстракта глиомы, несмотря на полностью зрелый фенотип сенсибилизированных им дендритных клеток, а с другой стороны – ставят вопрос исследования актуальности проблемы потенциальной иммуногенности антигенов реактивных астроцитов из периглиомной зоны.

В данной связи возможно использование сенсибилизирующего комплекса на основе дискретных антигенов реактивных астроцитов, однако гораздо более простым в техническом плане и не менее перспективным представляется получение культуры астроцитов, по фенотипу сходных с периглиомными, с целью выделения клеточного антигенного экстракта и использования его для сенсибилизации дендритных клеток. Изучение данного подхода и определяет направление дальнейшего развития нашего научного исследования.

PULSED DENDRITIC CELLS INTENDED FOR EXPERIMENTAL GLIOMA THERAPY

I.V. Chekhonin[1], D.I. Zhigarev, M.T. Zangieva, O.I. Gurina

V. P. Serbsky Federal Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia
[1]E-mail: Ivan-Chekhonin@yandex.ru

Malignant glioma immunotherapy has gained significant scientific interest for neurobiologists, as well as for clinicians, in recent years. Nowadays pulsed dendritic cells are one of the most important active immunotherapeutic strategies. There is a plenty of protocols as well as pulsing antigen combinations used to differentiate mature and immunogenic dendritic cells from hematopoietic progenitors *in vitro*.

In this study, we have obtained dendritic cells pulsed with C6 glioma extracts and proved their maturity by using morphological, cytometrical and functional methods. An available set of antibodies to neurospecific and glioma-associated antigens (GFAP, Cx43, BSAT1, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2) allowed us to evaluate the quantitative representation of the latter ones in C6 rat glioma tumor extracts. In conclusion, we assumed the possibility to modify tissue extracts, despite the complete dendritic cell maturity and rose a question to study potential immunogenicity of astrocytic periglioma zone antigens.

In this regard, it is possible to search discrete periglioma antigens useful for dendritic cells, but more technically simple is an idea of obtaining a culture of glioma-conditioned reactive astrocytes *in vitro* to prepare a cellular extract and to pulse the dendritic cells. This approach reflects the direction of our future research.

УДК 57.086.862

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

ВЛИЯНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ НА РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Бирюкова Г.К., Решетов И.В, Чехонин В.П.

Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, Россия
119034, Москва, пер. Кропоткинский, д. 23
e-mail: nastyanastyav@mail.ru

В данном исследовании были получены клетки обонятельной выстилки человека, предполагаемых для изучения регенеративных процессов в центральной нервной системе. Были оптимизированы протоколы для получения и культивирования нейральных стволовых/прогениторных клеток и обкладочных клеток из обонятельной выстилки.

Ключевые слова: обонятельная выстилка, клеточная терапия, центральная нервная система

Обонятельная выстилка (ОВ) человека рассматривается в качестве потенциального источника аутологичных клеток для клеточной терапии посттравматических повреждений спинного мозга (1) и при нейродегенеративных заболеваниях головного мозга, таких как болезнь Альцгеймера, шизофрения, биполярное расстройство и др. (2). Поскольку данные патологии связанны с гибелью большого числа нейронов, перспективным методом лечения может являться клеточная терапия. Для клеточной терапии наиболее перспективными считаются нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК) обонятельного эпителия, так как они способны дифференцироваться в зрелые нейроны (3), и обкладочные клетки из собственной пластинки эпителия ОВ, так как они создают микроокружение для нейронов, способствуют росту аксонов и ремиелинизации нервных волокон (4). Однако на сегодняшний день не разработан оптимальный, хорошо воспроизводимый протокол для получения достаточного количества этих клеток, которые могут быть использованы в регенеративной медицине ЦНС.

Целью данного исследования было разработать оптимальный протокол для получения клеток ОВ человека для клеточной терапии заболеваний центральной нервной системы.

В исследовании были использованы образцы ОВ, полученные из верхних и нижних носовых ходов у 15 пациентов при плановом хирургическом вмешательстве в Отделении пластической хирургии УКБ № 1. Данное исследование одобрено Локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Площадь образцов ОВ составляла 5–25 мм^2 (суммарно). В работе были оптимизированы методы получения первичной культуры и дальнейшего культивирования клеток из ОВ человека. НСПК и обкладочные клетки были идентифицированы методом иммунофлуоренценции по общепринятым маркерам.

Результаты. Были разработаны оптимальные протоколы получения и культивирования НСПК из обонятельного эпителия ОВ и обкладочных клеток из собственной пластинки эпителия ОВ. НСПК были выявлены по одновременной экспресии маркера стволовых клеток Sox-2 и маркера ранней нейральной дифференцировки nestin. Обкладочные клетки были выявлены по коэксперсии маркера GFAP (кислого глиального фибриллярного белка) и p75NTR (низкоаффиного рецептора фактора роста нервов).

Выводы. Разработанные оптимальные протоколы получения и культивирования НСПК и обкладочных клеток из ОВ человека воспроизводимы и могут быть использованы при создании клеточных препаратов для терапии заболеваний центральной нервной системы.

Литература:
1. *Xiao M., Klueber K.M., Guo Z., Lu C., Wang H., Roisen F.J. Human adult olfac-tory neural progenitors promote axotomized rubrospinal tract axonal reinnervation and locomotor recovery // Neurobiol. Dis. — 2007. — Vol. 26, № 2. — PP. 363–374.*
2. *Borgmann-Winter K, Willard SL, Sinclair D, et al. Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness. Transl Psychiatry. 2015;5:e527. doi: 10.1038/tp.2014.141.*
3. *Mackay-Sim A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa // Arch. Ital. Biol. — 2010. — Vol. 148, № 2. — PP. 47–58.*
4. *Ramón-Cueto A., Avila J. Olfactory ensheathing glia: properties and function // Brain Res. Bull. — 1998. — Vol. 46, № 3. — PP. 175–187.*

UDC 57.086.862

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

THE ROLE OF STEM CELLS OF OLFACTORY MUCOSA FOR REGENERATIVE PROCESSES IN CENTRAL NERVOUS

Voronova AD, Stepanova OV, Chadin AV, Biryukova GK, Rechetov IV, Chekhonin VP

The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russian Federation

e-mail: nastyanastyav@mail.ru

The cells of human olfactory mucosa were obtained in this research to study regenerative processes in the central nervous system. Protocols have been optimized for obtaining and cultivation of neural stem/progenitor cells and olfactory ensheathing cells of the olfactory mucosa.

Key words: olfactory mucosa, cell therapy, central nervous system

Human olfactory mucosa (OM) is regarded as a potential source of autologous cells for cell therapy of traumatic spinal cord injury (1), and in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, schizophrenia, bipolar disorder and other. (2). These pathologies are associated with the death of a large number of neurons, so the promising method of treatment can be a cell therapy. For the cell therapy the most promising are neural stem/ progenitor cells (NSPC) of olfactory epithelium, so they are able to differentiate into mature neurons (3), and olfactory ensheathing cells from lamina propria, since they create a microenvironment for neurons, promote the growth of axons and remyelination of neurons (4). However, the optimal and repeatable protocol to obtain a sufficient quantity of cells that can be used in regenerative medicine CNS has not been developed.

The purpose of this study was to develop the optimal protocol for obtaining cells of human OM for cell therapy of diseases of the central nervous system.

The samples of OM were obtained from 15 patients in the Sechenov First Moscow State Medical University. This study was approved by local ethics committee of Pirogov Russian National Research Medical University. The size of sapmles of OM was 5-25 mm^2 (total). In this work we were optimized methods for obtaining of primary culture and further culturing of human OM cells. NSPC and olfactory ensheathing cells were identified by using immunofluorescence.

Results. The optimal protocols for obtaining and cultivation of NSPC of olfactory epithelium and olfactory ensheathing cells from lamina propria were developed. NSPC were identified by the expression of stem cell marker Sox-2 and early neural differentiation marker nestin. Olfactory ensheathing cells were identified by GFAP (glial fibrillary acidic protein) and p75NTR (low affinity nerve growth factor receptor).

Conclusions. The optimal protocols for obtaining and cultivation of NSPC of olfactory epithelium and olfactory ensheathing cells from the human olfactory mucosa are repeatable and can be used to create the cell preparations for the treatment of diseases of the central nervous system.

References:

1. *Xiao M., Klueber K.M., Guo Z., Lu C., Wang H., Roisen F.J. Human adult olfac-tory neural progenitors promote axotomized rubrospinal tract axonal reinnervation and locomotor recovery // Neurobiol. Dis. — 2007. — Vol. 26, № 2. — PP. 363–374.*
2. *Borgmann-Winter K, Willard SL, Sinclair D, et al. Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuro-psychiatric illness. Transl Psychiatry. 2015;5:e527. doi: 10.1038/tp.2014.141.*
3. *Mackay-Sim A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa // Arch. Ital. Biol. — 2010. — Vol. 148, № 2. — PP. 47–58.*
4. *Ramón-Cueto A., Avila J. Olfactory ensheathing glia: properties and function // Brain Res. Bull. — 1998. — Vol. 46, № 3. — PP. 175–187.*

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СПИННОГО МОЗГА

Чао Жан[1-4], В.П. Баклаушев[2], А.Ю. Морозова[3], М.А. Абакумов[2], И.Л. Губский[2], П.А. Мельников[2], А.Н. Габашвили[2], А.В. Макаров[3], Сяо Тянь[5], Гван Ванг[1], Шикинь Фень[4], В.П. Чехонин[2,3]

[1]Кафедра опухолевых патологий костных и мягких тканей Клинического института рака Тяньцзиньского медицинского университета, Национальный клинический научно-исследовательский центр рака, Главная лаборатория профилактики и лечения рака, г. Тяньцзинь, Китай;
[2] Кафедра медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, Россия;
[3] Отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии Федерального медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, г. Москва, Россия;
[4] Отделение ортопедии клинической больницы Тяньцзиньского медицинского университета, г. Тяньцзинь, Китай;
[5] Кафедра иммунологии Клинического института рака Тяньцзиньского медицинского университета, г. Тяньцзинь, Китай.

Повреждение спинного мозга (ПСМ) – это травма спинного мозга, не являющаяся последствием заболевания. По результатам нашего ранее проведённого эпидемиологического исследования, коэффициент заболеваемости в Китае достиг 23,7 случая на миллион жителей в год. Коэффициент заболеваемости на глобальном уровне, согласно последним отчётам, находится в диапазоне от 9,2 до 246 случаев на миллион жителей в год. Пересадка стволовых клеток получила широкое признание в качестве метода лечения ПСМ. Первое описание мезенхимальных стволовых клеток (МСК) появилось в 1991 г., и эти клетки постепенно стали наиболее широко используемыми как в исследовательской, так и в хирургической практике. Прежде чем пересадка и трансформация ПСМ перейдёт в разряд официально утверждённого клинического метода, предстоит решить целый ряд проблем, включая определение оптимального времени пересадки, наиболее эффективного способа трансплантации и оптимального числа стволовых клеток. Изучив результаты текущих исследовательских работ и клинических испытаний, мы обнаружили, что число использованных в них МСК варьирует в диапазоне от 4×10^5 до 1×10^6 при проведении основных исследований и в диапазоне от 7×10^5 до 2×10^7 в клинических испытаниях. Наше исследование проводилось с целью определения оптимального числа трансплантируемых МСК для лечения ПСМ в хронической форме. Используя такие методы, как магнитно-резонансная томография (МРТ), диффузионно-тензорная визуализация (ДТВ), диффузионно-тензорная трактография (ДТТ), иммуногистохимическое исследование (ИГХ), гистологическое окрашивание и оценка с помощью поведенческих тестов, мы стремились выделить результаты воздействия различных количеств МСК на уменьшение размера участка повреждения и формирование посттравматической патологической полости, на подавление формирования глиозного рубца, на усиление реструктурирования нейронных волокон, на усиление аксональной регенерации и формирование отростков, улучшение васкуляризации, улучшение уровня экспрессии нейрональных факторов и на улучшении функции. По итогам сопоставления результатов нами было принято решение об оптимальном числе МСК для лечения ПСМ в хронической форме.

CELL THERAPY OF SPINAL CORD POSTTRAUMATIC CYSTS

Chao Zhang[1-4], V.P. Baklaushev[2], A.Y. Morozova[3], M.A. Abakumov[2], I.L.Gubsky[2], P.A. Melnikov[2], A.N. Gabashvily[2], Makarov A.V.[3], Xiao Tian[5], Guowen Wang[1], Shiqing Feng[4], V. P. Chekhonin[2,3]

Department of Bone and Soft Tissue Tumors, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, China;2Department of Medicinal Nanobiotechnology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; 3Department of Basic and Applied Neurobiology, Federal Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia; 4Department of Orthopedics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, China; 5Department of Immunology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin, China.

Spinal cord injury (SCI) is a traumatic injury to the spinal cord which is not a consequence of the disease. Our previous epidemiological research suggested the annual incidence in China reached 23.7 cases per million people. The global annual incidence was recently reported range from 9.2 to 246 cases per million. Stem cell transplantation has become a widely accepted treatment for overcoming SCI. The first description of Mesenchymal stem cells (MSCs) occurred in 1991. MSCs have gradually become one of the most used in research and surgery.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

Many issues need to be addressed before MSCs transplantation transformation progresses to formal clinical use, including the optimal transplantation timing, the most effective transplantation method and the optimal number of stem cells. After looking into the current studies and clinical trials, we found that the number of the employed MSCs are not uniform. The number of cells used ranged from 4×105 to 1×106 in the basic studies, and 7×105 to 2×107 in the clinical trials. In order to figure out the optimal number of MSCs for transplantation of the chronic SCI, we performed the present research. Using magnetic resonance imaging (MRI), diffusion tensor imaging (DTI), diffusion tensor tractography (DTT), immunohistochemistry, histological staining and behavior testing evaluations, we focused the effect of varying numbers of MSCs on reducing lesion cavity and post-traumatic syrinx formation, suppressing glial scar formation, enhancing neuronal fibers remodeling, promoting axonal regeneration and sprouting, improving vascularization, ameliorating the neuronal factors expressional level, and function improvement. After comparison, the optimal number of MSCs for treating chronic SCI was decided.

УДК 61:577.1

ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК В ГЛИОМАХ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Кошкин Ф.А., Никитин А.Г., Коновалов А.Н., Потапов А.А., Усачев Д.Ю., Пицхелаури Д.И., Кобяков Г.Л., Шишкина Л.В., Чехонин В.П.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1
e-mail: rsmu@rsmu.ru

Разработана система, основанная на количественном определении экспрессии оригинального набора микроРНК и генов MDR1, ABCG2, p21 и BCL2 в биоптатах глиом, позволяющая диагностировать глиальные опухоли. На основе данной группы маркеров создан классификатор степени злокачественности глиом.

Ключевые слова: микроРНК, опухоли мозга, глиома, диагностика, РТ-ПЦР, экспрессия.

Глиомы являются наиболее распространенными первичными опухолями мозга, составляющими около 75% внутричерепных опухолей. Средний срок жизни пациентов с диагнозом мультиформная глиобластома после удаления опухоли составляет примерно 12-15 месяцев при прохождении стандартного курса радиотерапии и химиотерапии темозоломидом. Полное удаление глиом хирургическим путем невозможно в связи с тем, что опухоль активно инфильтрирует паренхиму мозга. Таким образом, современные подходы к лечению глиом (химио- и радиотерапия, хирургическая резекция) не гарантируют полного выздоровления пациента. В опухолевой ткани происходят существенные изменения уровней экспрессии различных микроРНК – малых некодирующих РНК, которые играют важнейшую роль в регуляции транскрипционной и пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов.

На данный момент накоплен значительный опыт по количественному определению экспрессии микроРНК в глиомах с использованием различных методов. Однако большая часть этих работ выполнена на малых выборках биологических образцов. Данные по экспрессии микроРНК нормированы относительно уровней экспрессии различных генов «домашнего хозяйства». Это осложняет интерпретацию данных и выбор микроРНК – кандидатов для диагностики глиом. Изучение влияния микроРНК на механизмы патогенеза и развития глиом также может сыграть существенную роль в усовершенствовании стандартных методик лечения глиом и стать новым перспективным направлением в диагностике данного вида онкологических заболеваний.

Нами было продемонстрировано, что, используя систему, основанную на количественном определении экспрессии микроРНК и генов (микроРНК-21, -23a, -137, -181a, -181b, -222, -10a, -7, гены MDR, ABCG2, p21 и BCL2) в биоптатах глиом, позволяет диагностировать глиальные опухоли с чувствительностью 98,4% и специфичностью 87,2% при точности 96,4%. На основе данной системы был построен классификатор степени злокачественности глиом, позволяющий определить ее с точностью 69,5%.

Литература:
1. Кошкин Ф.А. Изучение профиля экспрессии микроРНК в опухолях мозга разной степени злокачественности

/ Ф.А. Кошкин, Д.А. Чистяков, А.Г. Никитин, А.Н. Коновалов, А.А. Потапов, Д.Ю. Усачев, Д.И. Пицхелаури, Г.Л. Кобяков, Л.В. Шишкина, В.П. Чехонин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины - 2014 - Т. 157. - № 6. - С. 794-797.
2. *Кошкин Ф.А. Роль микроРНК в механизмах устойчивости глиобластом к радио- и химиотерапии / Ф.А. Кошкин, Д.А. Чистяков, В.П. Чехонин // Биохимия - 2013 - Т. 78. - № 4. - С. 325-334.*
3. *Koshkin P.A. Analysis of expression of microRNAs and genes involved in the control of key signaling mechanisms that support or inhibit development of brain tumors of different grades / P.A. Koshkin, D.A. Chistiakov, A.G. Nikitin, A.N. Konovalov, A.A. Potapov, D.Y. Usachev, D.I. Pitskhelauri, G.L. Kobyakov, L.V. Shishkina, V.P. Chekhonin // Clin Chim Acta. - 2014 - T. 430. - C. 55-62.*

UDC 61:577.1

EXPRESSION OF MICRORNA IN GLIOMAS OF DIFFERENT GRADE

Koshkin P.A., Nikitin A.G., Konovalov A.N., Potapov A.A., Usachev D.Y., Pitskhelauri D.I., Kobyakov G.L., Shishkina L.V., Chekhonin V.P.

Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Russia, Moscow, Ostrovitianov str. 1
e-mail: rsmu@rsmu.ru

A system based on the quantification of the expression level of microRNAs and genes MDR1, ABCG2, p21, BCL2 in glioma biopsies, was developed, allowing to diagnose glial tumors. Also according to the expression profile of this group of markers, we made a classifier of glioma grades.

Key words: microRNA, brain tumor, glioma, diagnostics, RT-PCR, expression.

Gliomas are the most common primary brain tumors, account for about 75% of intracranial tumors. The median of survival for patients with glioblastoma multiforme after removal of the tumor is approximately 12-15 months, if the patient passes a standard course of radiotherapy and chemotherapy with temozolomide. Complete surgical removal of gliomas is impossible due to the fact that tumor infiltrates brain tissue very fast. Thus, modern approaches to the treatment of gliomas (chemotherapy and radiotherapy, surgical resection) does not guarantee full recovery of the patient. In tumor tissue significant changes of expression levels of different microRNA occur. MicroRNA - small non-coding RNAs, which play a crucial role in the regulation of transcription and post-transcription gene expression.

Now, we have accumulated considerable experience in the quantification of microRNA expression in gliomas using a variety of methods. However, most of these works were performed on small groups' of biological samples. Data on the expression of microRNA levels were normalized with the help of various "housekeeping" genes. This complicates the interpretation of the data and the selection of microRNA, which are more suitable for the glioma diagnostics. The understanding of the influence of miRNAs on the mechanisms of pathogenesis and development of gliomas can also play a significant role in improving the standard methods of glioma treatment and become a new promising aim in the diagnosis of this type of cancer.

We have demonstrated that by using a system based on the quantification of microRNA and gene expression levels (miR-21, -23a, -137, -181a, -181b, -222, -10a, -7, genes – MDR1, ABCG2, p21 and BCL2) in biopsy specimens of gliomas, glial tumors can be diagnosed with a sensitivity of 98.4% and a specificity of 87.2% with an accuracy of 96.4%. Based on this system the classifier of glioma grades was built, which allows to determine it with an accuracy of 69.5%

References:

1. *Koshkin P.A. The study of the expression profile of microRNAs in tumors of different grade / P.A. Koshkin, D.A. Chistiakov, A.G. Nikitin, A.N. Konovalov, A.A. Potapov, D.Y. Usachev, D.I. Pitskhelauri, G.L. Kobyakov, L.V. Shishkina, V.P. Chekhonin // Bulletin of Experimental Biology and Medicine - 2014 - T. 157. - № 6. - P. 794-797.*
2. *Koshkin P.A. Role of microRNAs in glioblastoma mechanisms of resistance to radiotherapy and chemotherapy / P.A. Koshkin, D.A. Chistiakov, V.P. Chekhonin // Биохимия - 2013 - Т. 78. - № 4. - P. 325-334.*
3. *Koshkin P.A. Analysis of expression of microRNAs and genes involved in the control of key signaling mechanisms that support or inhibit development of brain tumors of different grades / P.A. Koshkin, D.A. Chistiakov, A.G. Nikitin, A.N. Konovalov, A.A. Potapov, D.Y. Usachev, D.I. Pitskhelauri, G.L. Kobyakov, L.V. Shishkina, V.P. Chekhonin // Clin Chim Acta. - 2014 - T. 430. - P. 55-62.*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 616.8

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕДКО ИОНИЗИРУЮЩЕГО ФОТОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO И IN VIVO

Зоркина Я.А.

Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им.В.П.Сербского
119991, г. Москва, Кропоткинский пер., д.23
e-mail: zrkyana@gmail.com

На модели ГЭБ in vitro после облучения показано нарушение изменение морфологии клеток, изменение синтеза белков и генов межклеточных контактов. Показано нарушение проницаемости ГЭБ in vivo в направлении кровь-мозг и мозг-кровь при различных схемах фракционированной радиотерапии.

Ключевые слова: ГЭБ, фракционированная радиотерапия, модель ГЭБ in vitro, VEGF, GFAP

Нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) является ключевой особенностью радиационного поражения центральной нервной системы [1]. В данной работе облучение модели ГЭБ *in vitro,* предствляющую собой клетки HUVEC кокультивированные с человеческими астроцитами, дозами 2, 4 и 6 Гр приводит к изменению морфологии клеток, изменению синтеза белков межклеточных контактов. Показано уменьшение экспрессии мРНК и белков плотных (ZO-1, Claudin 5) и адгезивных (VE Cadherin, β-catenin) контактов.

В оценке проницаемости ГЭБ in vivo в направлении мозг-кровь применялся метод количественного определения в плазме крови нейроспецифического белка GFAP (глиофибриллярный кислый белок). Мониторирование уровня GFAP в крови широко описано при многих патологиях ЦНС, и позволяет охарактеризовать как степень изменений в ЦНС, так и оценить прогноз того или иного состояния.

Показателем увеличения проницаемости ГЭБ в направлении кровь-мозг является обнаружение в ткани мозга веществ, в норме не проникающих через барьер. В нашем исследовании мы использовали антитела к GFAP и VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), меченных флуоресцентными красителями. Флуоресценция от внутривенно введенных антител визуализируется в клетках-мишенях, экспрессирующих VEGF и GFAP, а не в микроциркуляторном русле.

Множество фундаментальных исследований проведено при однократном воздействии, однако в клинике в основном применяется фракционированная радиотерапия [2]. Определение способа фракционирования дозы, сравнение режимов фракционирования, в особенности для минимизации побочных эффектов – актуальная задача для радиологии. Следовательно, для улучшения результатов лучевой терапии различные режимы фракционирования должны быть проверены в доклинических испытаниях на модели здоровой ткани мозга животного, так как существующие радиобиологические модели не всегда пригодны для этих целей. [3]. В данной работе использовались несколько схем облучения: с одинаковой суммарной общей дозой (СОД) (2Гр*18 фракций, 4Гр*9 фракций и 6Гр*6 фракций) и подобной биологически эффективной дозой (БЭД) (3Гр*8 фракций, 6Гр*5 фракций, 5Гр*7 фракций).

При анализе экспрессии белков и генов VEGF и GFAP в здоровой ткани мозга крыс обнаружены изменения на поздних сроках после облучения – от 4 до 12 недель. При сравнении режимов фракционирования единой СОД, не показано нарастание патологических эффектов в зависимости от БЭД при анализе экспрессии гена GFAP в гиппокампе на 12 неделе после облучения, и VEGF в префронтальной коре на 4 и 8 неделе. При сравнении режимов с эквивалентной БЭД не показаны одинаковые эффекты облучения на экспрессию VEGF в среднем мозге на 12 неделе после облучения.

Таким образом, воздействие редко ионизирующего фотонного излучения, привело к изменению структур и функций компонентов ГЭБ in vitro и in vivo.

Литература:

1. *Nordal R.A., Wong C.S. Molecular targets in radiation-induced blood–brain barrier disruption // Int. J. RadiatOncol. Biol. Phys. – 2005 - №62 - P.279–287*
2. *Balentova S., Hajtmanova E., Kinclova I., Lehotsky J., Dobrota D., Adamkov M. Radiation-induced Long-term Alterations in Hippocampus under Experimental Conditions // KlinOnkol – 2012 - № 25(2) - P.110–116*
3. *Dilworth J.T., Krueger S.A., Wilson G.D., Marples B. Preclinical Models for Translational Research Should Maintain Pace With Modern Clinical Practice // Int J Radiation Oncol Biol Phys – 2014 - №88(3) - P.540-544*

UDK 616.8

BLOOD BRAIN BARRIER PERMEABILITY AFTER IRRADIATION: IN VIVO AND IN VITRO EFFECTS

Zorkina Y.A.

Serbsky federal medical research centre for psychiatry and narcology, Moscow, Russia
119991, Moscow, Kropotkinsky lane 23
e-mail: zrkyana@gmail.com

It was demonstrated a change in cell morphology, changes in the synthesis of proteins and genes of cell-cell contacts on the BBB in vitro model after irradiation. It was observed the changes in BBB permeability in vivo in the blood-brain direction and brain-blood direction under different schemes of fractionated radiotherapy.

Key words: BBB, fractionated radiotherapy, BBB in vitro model, VEGF, GFAP

An alteration in blood-brain barrier permeability (BBB) is a key feature of radiation damage to the central nervous system [1]. In this study, we use the BBB in vitro model, which consists of HUVEC cells co-cultured with human astrocytes. We observe a change in cell morphology, protein synthesis of cell-cell contacts after irradiation (2, 4 and 6 Gy). Expression of tight junction genes and proteins (ZO-1, Claudin 5) and adhesive junction genes and proteins (VE Cadherin, β-catenin) were decreased.

BBB permeability *in vivo* in the direction of the blood-brain was evaluated by quantitative measuring the plasma concentration of neurospecific protein GFAP (glial fibrillary acidic protein). Monitoring of GFAP level in blood is widely described in many pathologies of the CNS and allows to characterize the degree of changes in the CNS, and to evaluate the prognosis of a condition.

The increasing BBB permeability in the direction of the blood-brain can be observed by detecting substances in brain tissue which not normally penetrate through the BBB. In our study we used anti-GFAP and anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) antibody, labeled with fluorescent dyes. We demonstrated that fluorescence from intravenously administered antibodies was visualized in target cells expressing VEGF and GFAP, and not in the microvasculature.

Many fundamental studies have been conducted with single exposure, but fractionated radiotherapy mainly applied in the clinic [2]. Urgent tasks for radiology are the dose fractionation determining, comparison of fractionation regimes in order to minimize side-effects after radiation damage. Existing radiobiological models are not always suitable for these purposes. Therefore, to improve the results of fractionation radiotherapy different modes must be tested in preclinical studies on animal models [3]. In this study we used multiple fractionation schemes: with the same total dose (2Gy * 18 fractions, 4 Gy * 9 fractions and 6 Gy * 6 fractions), and with the same biologically effective dose (BED) (3 Gy * 8 fractions, 6 Gy * 5 fractions, 5 Gy * 7 fractions).

We observed rarely changes in the expression of VEGF and GFAP proteins and genes in the healthy rat brain tissue after irradiation on the later stages (from 4 to 12 weeks). It was not shown the increase of pathological effects depending on the BED in the expression analysis of GFAP gene in the hippocampus at 12 weeks after irradiation and VEGF in the prefrontal cortex of 4 and 8 week when comparison schemes with the same total dose. It was not showed the same effects of irradiation on VEGF expression in the midbrain at 12 weeks after irradiation when compared the regimes with equivalent BED.

Thus, we showed changes in the structure and functions of the BBB components in vivo and in vitro after irradiation.

References:
1. Nordal R.A., Wong C.S. Molecular targets in radiation-induced blood–brain barrier disruption // Int. J. RadiatOncol. Biol. Phys. – 2005 - №62 - P.279–287
2. Balentova S., Hajtmanova E., Kinclova I., Lehotsky J., Dobrota D., Adamkov M. Radiation-induced Long-term Alterations in Hippocampus under Experimental Conditions // KlinOnkol – 2012 - № 25(2) - P.110–116
3. Dilworth J.T., Krueger S.A., Wilson G.D., Marples B. Preclinical Models for Translational Research Should Maintain Pace With Modern Clinical Practice // Int J Radiation Oncol Biol Phys – 2014 - №88(3) - P.540-544

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 578. 223

ЭФФЕКТИВНАЯ ПРОДУКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРА РЕПЛИКОНА РНК-СОДЕРЖАЩЕГО ВИРУСА

Ю.Г. Ким, А.Ж. Балтабекова, А.В. Шустов, Е.М. Раманкулов

Национальный центр биотехнологии Комитета науки МОН РК, Астана, Казахстан
010000, г.Астана, Кургальжинское шоссе, строение 13/5
e-mail: info@biocenter.kz

Создан вектор для белковой экспрессии в культурах клеток млекопитающих, представляющий собой автономно реплицирующийся фрагмент генома (репликон) вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (VEE). VEE – РНК-содержащий вирус, представитель рода Alphavirus сем. Togaviridae.

Ключевые слова: вирус,VEE, репликон, белковая экспрессия, Г-КСФ

Технологии белковой экспрессии в культурах клеток высших эукариот широко востребованы для промышленного производства ряда рекомбинантных белков, в т.ч. белков с фармакологическим действием (эритропоэтин, факторы свёртываемости XIII, IX и др.). В настоящее время в биофармацевтической промышленности единственным типом мобилизуемых векторов являются плазмиды. При использовании плазмидных векторов для эукариотической экспрессии уровень продукции рекомбинантного белка трансфецированной культурой не остаётся постоянным и, обычно, быстро падает со временем. Использование экспрессионных векторов на основе геномов РНК-вирусов с цитоплазматической репликацией позволяет получить эффективные системы экспрессии. Экспрессия рекомбинантных белков посредством трансляции с РНК, которые автономно реплицируются в цитоплазме клетки и не использует ядерный аппарат клетки, позволяет обойти ограничения по выходу белка, связанные с эффективностью транскрипции, процессинга и ядерного транспорта мРНК. РНК-репликоны в присутствии структурных белков гомологичного вируса могут быть легко упакованы в вирионы т.н.псевдоинфекционного вируса. Использование псевдоинфекционного вируса вместо ДНК-трансфекции для доставки экспрессионной конструкции в культивируемые клетки позволяет упростить и удешевить процесс получения продуцирующих культур.

Нами создан вектор для белковой экспрессии в культурах клеток млекопитающих, представляющий собой автономно реплицирующийся фрагмент генома (репликон) вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (VEE). VEE – РНК-содержащий вирус, представитель рода Alphavirus сем. Togaviridae. Репликация альфавирусов сопровождается синтезом в клетке большого количества вирусных РНК, из которых основным видом является т.н. субгеномная РНК. Использование природного механизма синтеза вирусныхсубгеномных РНК позволяет получить эффективную трансляцию рекомбинантного белка и обеспечить у рекомбинантного полипептида правильные (аналогичные природному прототипу) N- и С-концы. Репликоны VEE могут быть использованы для продукции в культурах клеток млекопитающих и насекомых.

В качестве примера белка с фармакологическим действием, для демонстрации возможностей экспрессионной системы на основе репликона РНК-вируса, использовали гранулоцитарныйколониестимулирующий фактор человека (Г-КСФ). Г-КСФ широко применяется в медицине для лечения иммуносупрессивных состояний.

Ген Г-КСФ с сигнальным пептидом для секреторной экспрессии клонирован в репликон VEE в составе генной кассеты, обеспечивающей одновременную продукцию Г-КСФ и маркёра устойчивости к антибиотику пуромицину. Продемонстрирована секреторная продукция Г-КСФ, что подтверждает эффективный синтез и правильный процессинг белка-предшественника. Рекомбинантный человеческий Г-КСФ очищен из среды инкубации до электрофоретической чистоты (>~95%) с помощью комбинации ионообменной хроматографии и хроматографии гидрофобного взаимодействия. Уровни продукции составили 113,3 мкг гликозилированного Г-КСФ с одной культуральнойкубышки Т150 за инкубацию продолжительностью 10 дней.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

UDC 578. 223

EFFECTIVE PRODUCTION OF RECOMBINANTHUMANGRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTORIN MAMMALIAN CELL CULTURE USING VECTOR BASED ON THE RNA-VIRUS REPLICON

Yu. Kim, A. Baltabekova, A. Shustov, E. Ramanculov

National Center for Biotechnology Committee of Science MES RK, Astana, Kazakhstan
010000, Astana, 13/5, Korgalzhyn road,
e-mail: info@biocenter.kz

We produced a vector for protein expression in cell cultures, which is an autonomously replicating fragment of genome (replicon) of the Venezuelan equine encephalomyelitis virus (VEE). The VEE is a RNA-containing virus, member of the genus Alphavirus, fam. Togaviridae.

Key words: virus, VEE, replicon, protein expression, G-CSF

Technologies for expression of recombinant proteins in cell cultures are widely used in industry for production of some important recombinant proteins, including the ones with pharmacological activity (erythropoietin, coagulation factors XIII, IX, etc.). Currently, in industry the only utilized type of mobilized vectors is plasmids. Utilization of plasmids for eukaryotic expression leads to the silencing of expression of the recombinant protein over time. Utilization of the genomes of RNA viruses with a cytoplasmic replication as vectors allows to obtain effective expression systems. Use of RNA molecules which autonomously replicate in the cytoplasm of infected or transfected cells and which do not employ the cell nucleus-bound processes such as the transcription, processing and nuclear transport of mRNA, may circumvent limitations on protein yields associated with the efficiency of the nuclear processes. Moreover, the RNA replicons (which cannot packaged themselves) can be easily packaged into virions *in trans* (i.e. in the presence of structural proteins of a homologous virus), producing the s.c.pseudoinfectious virus. Use of infection with a pseudoinfective virus in place of DNA transfection for the delivery of expression constructs into cultured cells represents a simple and cheap delivery technology with practically unlimited scalability.

We produced a vector for protein expression in cell cultures, which is an autonomously replicating fragment of genome (replicon) of the Venezuelan equine encephalomyelitis virus (VEE). The VEE is a RNA-containing virus, member of the genus Alphavirus, fam. Togaviridae. Replication of alphaviruses in cells is accompanied by a synthesis of large quantities of viral RNAs, the most prevalent type of the RNAs being the s.c.subgenomic RNA. Use of a natural mechanism which leads to production of the subgenomic RNA allows to obtain efficient translation of the recombinant protein and to ensure that the translated polypeptide has correct N- and C-termini. The VEE replicons can be used for production in cultured mammalian and insect cells.

As an example of a protein with pharmacological activity and to demonstrate the capabilities of the RNA-replicon-based expression system we used human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). G-CSF is widely used in medicine for the treatment of immunosuppressive diseases.

Gene encoding the G-CSF with a signal peptide for secretory expression was cloned into VEE replicon as a part of a gene cassette. The gene cassette provides simultaneous production of the G-CSF and an antibiotic resistance marker (puromycin acetyltransferase). Accumulation of the glycosylated G-CSF in cultural medium of transfected or infected cultures was demonstrated, which confirms the efficient synthesis and correct processing of the precursor protein. The recombinant human G-CSF was purified from the medium to electrophoretic purity (~95%) by a combination of ion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. Production levels were 113.3 micrograms of the glycosylated G-CSF from a single T150 culture flask during the incubation period of 10 days.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 577.152.34

ФЕРМЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ МИКРОМИЦЕТОВ С ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПО ОТНОШЕНИЮ К КОМПОНЕНТАМ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Осмоловский А.А., Котова И.Б., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Шаркова Т.С., Егоров Н.С.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
11992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: aosmol@mail.ru

Показана перспективность разработки новых способов получения препаратов на основе внеклеточных протеиназ микромицетов *Arthrobotrys longa, Trichotecium roseum* и *Tolypocladium inflatum* для лечения тромбоэмболических осложнений. Ведутся исследования по применению протеиназ-активаторов белков системы гемостаза из *Aspergillus ochraceus* и *Aspergillus terreus* в качестве диагностикумов.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитические ферменты, активаторы белков системы гемостаза, энзимодиагностика, энзимотерапия

Большинство имеющихся препаратов для лечения и своевременного предупреждения тромбоэмболических осложнений обладают недостаточной специфичностью действия и высокой стоимостью, а их применение в терапии подобных заболеваний сопряжено с рисками возникновения побочных эффектов. Поэтому актуальной задачей современной биотехнологии является поиск и разработка новых способов получения препаратов, в частности, основанных на протеолитических ферментах микроскопических грибов.

Огромный интерес для практической медицины представляют протеиназы микромицетов, обладающие высокой фибринолитической активностью и способностью к активации некоторых белков системы гемостаза путем их ограниченного протеолиза. Исследования последних лет в МГУ имени М.В. Ломоносова показали, что микромицеты способны секретировать протеиназы, высокоактивно расщепляющие фибрин и фибриноген, а также активирующие протеин С, плазминоген, фактор Х и прекалликреин – ключевые белки системы гемостаза, изменение содержания которых в кровотоке приводит к разного рода заболеваниям. Такие ферменты являются высоко специфичными к указанным белкам-мишеням и могут оказаться весьма перспективными для разработки лекарственных и диагностических препаратов отечественного производства для замены существующих зарубежных аналогов, в основном животного происхождения.

Так, на основе протеиназ микроскопических грибов *Trichothecium roseum* и *Arthrobotrys longa,* были разработаны тромболитические препараты – триаза и лонголитин, которые показали эффективность в лечении тромбозов в опытах на животных, что указывает на перспективность поиска продуцентов таких ферментов среди микромицетов. Недавно найден новый штамм энтомопатогенного гриба *Tolypocladium inflatum* k1, протеиназа которого проявляет высокую активаторную к плазминогену активность, превышающую на 20% фибринолитическую активность.

Aspergillus ochraceus образует протеиназы – активаторы протеина С и фактора Х, по свойствам схожие с протеазами-активаторами, получаемыми из яда южно-американского щитомордника и гадюки Рассела, соответственно, и используемыми для диагностики этих белков в настоящее время. Характер калибровочных графиков для определения содержания в плазме крови протеина С и фактора Х, полученных с использованием протеиназ *Aspergillus ochraceus*, очень близки к характеру графиков коммерческих аналогов (на основе протеиназ яда змей). Проверка применимости полученных калибровочных графиков была осуществлена путем проведения соответствующих реакций с плазмами с искусственно сниженным содержанием протеина С и фактора Х или дефицитных по ним и показала, что уровень их содержания достоверно определяется с помощью протеиназ *Aspergillus ochraceus.*

Aspergillus terreus – продуцент протеиназ с доказанной активаторной к прекалликреину активностью. В настоящее время ведется разработка диагностикума для определения содержания в плазме крови прекалликреина на основе образуемых этим микромицетом протеиназ.

Литература:
1. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. Выявление мишеней

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

действия внеклеточных протеаз – активаторов белков системы гемостаза, образуемых микромицетами Aspergillus ochraceus и Aspergillus terreus //Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41, №. 5. – С. 559-564.
2. *Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О. Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Скрининг продуцентов протеиназ с фибринолитической и коллагенолитической активностями среди микромицетов // Микробиология. – 2015. – Т. 84, №. 3. – С. 316-322.*

UDC 577.152.34

ENZYME COMPLEXES OF MICROMYCETES WITH PROTEOLYTIC ACTIVITY IN RELATION TO COMPONENTS OF THE HEMOSTASIS SYSTEM FOR THERAPY AND DIAGNOSIS OF THROMBOEMBOLIC DISEASES

Osmolovskiy A.A., Kotova I.B., Kreyer V.G., Baranova N.A., Sharkova T.S., Egorov N.S.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 11992, Moscow, Lenin Hills, 1-12
e-mail: aosmol@mail.ru

The prospects of the development of new methods for the preparation of drugs based on the extracellular proteases of micromycetes *Arthrobotrys longa*, *Trichotecium roseum* and *Tolypocladium inflatum* for the treatment of thromboembolic complications were shown. Research on the use as diagnostics of protease-activating proteins of the hemostatic system, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus* is being conducted.

Key words: proteinases of micromycetes, fibrinolytic enzymes, activators of proteins of the hemostatic system, enzyme diagnostics, enzyme therapy

Most available drugs for the treatment and timely prevention of thromboembolic complications have insufficient specificity of action and high cost, and their use in the treatment of these diseases is associated with the risk of side effects. Therefore, the actual problem of modern biotechnology is to find and develop new methods for producing drugs, in particular, based on proteolytic enzymes of microscopic fungi.

Huge interest for practical medicine have proteinases of micromycetes with high fibrinolytic activity and the ability to activate some of the hemostatic system proteins by their limited proteolysis. Recent studies at Moscow State University showed that fungi are able to secrete proteases, highly cleaving fibrinogen and fibrin and activating protein C, plasminogen, prekallikrein and factor X - core proteins of the hemostatic system, changing the content of which in the blood stream leads to various diseases. Such enzymes are highly specific to these target proteins and may prove to be very promising for the development of drugs and diagnostic products of Russian production to replace the existing foreign counterparts, mainly of animal origin.

So, on the basis of microscopic fungi proteinase of *Trichothecium roseum* and *Arthrobotrys longa* some thrombolytic drugs (Triase and Longolitin) have been developed. It was shown efficacy in the treatment of thrombosis in animal studies with these enzymes. These studies indicate a promising search of producers of these enzymes among micromycetes. Recently we found a new strain of entomopathogenic fungus *Tolypocladium inflatum* k1 – producer of proteinase with high plasminogen activator activity, which was to be 20% higher than its fibrinolytic activity.

Aspergillus ochraceus is the producer of proteinases – activators of protein C and factor X. Their properties are similar to proteinases-activators derived from the venom of the southern American copperhead snake and Russell's viper, respectively, and which used for the diagnosis of these proteins is currently. The character of the calibration curves for determination in plasma protein C and factor X levels in case of usage proteinase of *Aspergillus ochraceus* is very close to the character of commercial analogs' schedules (based on snake venom proteases). Applicability of the calibration curves was checked by suitable reactions with plasmas with artificially reduced level of protein C and factor X or deficient plasmas. It was shown that the level of their content reliably is determined using of proteases of *Aspergillus ochraceus*.

Aspergillus terreus is the producer of proteases with proved prekallikrein-activation activity. The development of a diagnostic kit for the determination of plasma prekallikrein formed on the basis of this micromycetal proteases is being developed.

References:
1. *Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes Aspergillus*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

ochraceus and Aspergillus terreus // Rus. J. Bioorg. Chem. – 2015. – V. 41, №. 5. – P. 500-505.
2. *Scharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic activity among micromycetes // Microbiology. – 2015. – V. 84, №. 3. – P. 359-354.*

УДК 621.039.7

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКТИНОВ В МИКРОПЛАНШЕТНОМ АНАЛИЗЕ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Гендриксон О.Д.[1], Смирнова Н.И.[1], Жердев А.В.[1], Гаспарян В.К.,[2] Дзантиев Б.Б.[1]

[1]Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33
E-mail: odhendrick@gmail.com
[2]Институт биохимии им. Г.Х. Бунятяна Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения
Армения, Ереван, 0014, ул. П. Севака, д. 5/1

Разработана методика лектиноферментного анализа (ЛФА) в микропланшетном «сэндвич»-формате бактериальных патогенов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. На основе лектинов из касторовых бобов и пшеницы реализован ЛФА клеток с пределами обнаружения 4 x 10^6 и 4 x 10^5 клеток/мл для *E. coli* и *St. aureus*, соответственно.

Ключевые слова: лектиноферментный анализ, бактериальные клетки, лектины, углеводы.

В связи с ростом числа инфекционных заболеваний по всему миру в последние годы большое внимание уделяется разработке новых подходов для высокочувствительного выявления бактериальных патогенов. Перспективными для детекции патогенов являются тест-системы, предполагающие использование углеводных компонентов клеточных стенок бактерий в качестве детектируемых лигандов и обеспечивающие получение количественного результата в течение нескольких часов. Углеводные структуры, природными рецепторами которых являются белки неиммунного происхождения – лектины, – представлены на поверхности клеток в больших количествах, обеспечивая возможность присоединения сотен или тысяч селективных рецепторов и, соответственно, выявления сопоставимого числа маркеров.

В данном исследовании разработан анализ бактериальных патогенов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, основанный на взаимодействии клеточной стенки микроорганизмов с лектинами. Лектиноферментный анализ бактериальных клеток впервые реализован в микропланшетном «сэндвич»-формате с образованием комплекса «иммобилизованный лектин – клетка – биотинилированный лектин». Исследована специфичность ряда растительных лектинов в отношении *E. coli* и *St. aureus,* и выбраны лектины, характеризующиеся высокой аффинностью связывания с клетками. На основе лектинов из касторовых бобов и пшеницы реализован ЛФА клеток с пределами обнаружения 4 x 10^6 и 4 x 10^5 клеток/мл для *E. coli* и *St. aureus*, соответственно. Для клеток *E. coli* сопоставлены два формата анализа – иммуноферментный и лектиноферментный; показано отсутствие достоверных различий по величине предела обнаружения. Благодаря доступности и универсальности лектиновых реагентов предложенный подход перспективен для контроля широкого ряда бактериальных патогенов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-53-05089-Арм_а) и Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения (проект 15RF-030).

UDC 621.039.7

APPLICATION OF LECTINS IN MICROPLATE ANALYSIS OF PATHOGENIC MICROORGANISMS

Hendrickson O.D.[1] Smirnova N.I.[1], Zherdev AV[1], Gasparyan V.K.[2], Dzantiyev B.B.[1]

[1] Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky Prospect, 33
E-mail: odhendrick@gmail.com
[2] G.H. Bunyatyan Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia
Armenia, Yerevan, 0014, P. Sevak street, 5/1

An enzyme-linked lectinosorbent assay (ELLSA) of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial pathogens in microplate "sandwich"–format was developed. Wheat germ agglutinin and *Ricinus communis* agglutinin were used to develop enzyme-linked lectinosorbent assays for *E. coli* and *S. aureus* cells with the detection limits of 4×10^6 and 5×10^5 cells/mL, respectively.

Key words: Enzyme-linked lectinosorbent assay, bacterial cells, lectins, carbohydrates

Due to the current worldwide growth of infectious diseases, much attention must be paid to the development of new approaches for the high-sensitivity detection of bacterial pathogens. Test systems to detect pathogens based on carbohydrate components of bacterial cell walls as detectable ligands that provide quantitative results within a few hours are promising to solve this problem.

In this study, the binding specificity of several plant lectins to *E. coli* and *S. aureus* cells was studied and pairs characterized by high-affinity interactions were selected for the assay. Wheat germ agglutinin and *Ricinus communis* agglutinin were used to develop enzyme-linked lectinosorbent assays for *E. coli* and *S. aureus* cells with the detection limits of 4×10^6 and 5×10^5 cells/mL, respectively. Comparison of the enzyme-linked immonosorbent assay and the enzyme-linked lectinosorbent assay demonstrated no significant differences in detection limit values for *E. coli*. Due to the accessibility and universality of lectin reagents, the proposed approach is a promising tool for the control of a wide range of bacterial pathogens.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 15-53-05089-Arm_a) and State Committee of Ministry of Science and Education of Armenia (project 15RF-030).

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 57.088.1

МЕТОД кцПЦР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА ПРИМЕРЕ МУТАЦИИ 11778A>G

Софронова Ю.К., Мазунин И.О.

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта
Калининград, Россия 236000, ул.Университетская д.2
e-mail: sofronovaYK@yandex.ru

Показана возможность использования кцПЦР для детекции гетероплазмии митохондриальной ДНК и подсчета абсолютного числа копий мутантных молекул митохондриальной ДНК в расчете на 1 клетку.

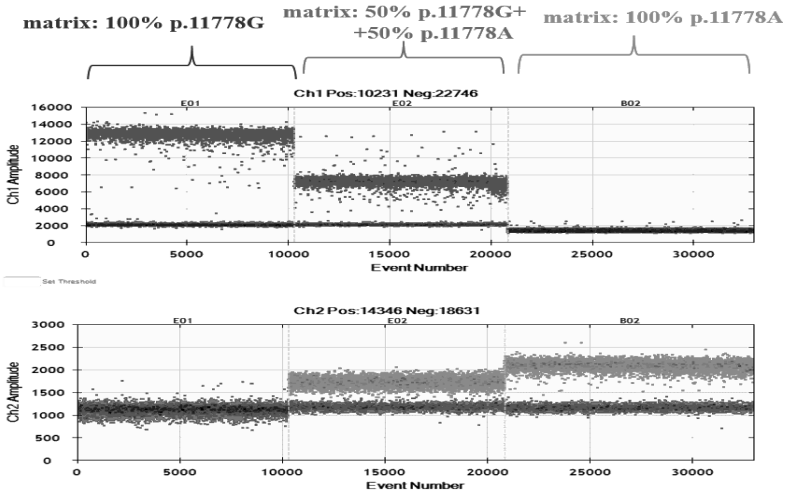
Ключевые слова: мтДНК, мутации, гетероплазмия, кцПЦР.

По мимо ядра только митохондрии из остальных органелл клетки человека, имеют собственные небольшие молекулы ДНК. Мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК) могут приводить к нарушению выработки энергии и, в конечном счете, к клеточной гибели. Существует обширный круг наследствен-

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

ных заболеваний, связанных с мутациями в мтДНК. Так как в клетке присутствует одновременно несколько мтДНК это приводит к феномену гетероплазмии – состоянию, когда в клетке одновременно присутствует смесь различных вариантов мтДНК с мутациями и без них. И состояние гетероплазмии мутации является одним из основных критериев её патогенности. Заболевание начинает проявляться клинически и прогрессировать при достижении мутантными мтДНК определенного количественного значения, что называется пороговым эффектом [1]. Современные методы позволяют выявлять долю мутантных форм мтДНК на уровне 5 % - 10 % что достаточно для ранней диагностики митохондриальных заболеваний [2]. Наследственная оптическая нейропатия Лебера (LHON) обусловлена мутациями в структурных генах мтДНК. Клинически LHON характеризуется дегенерацией ганглиозного слоя сетчатки и атрофией зрительного нерва. Около 95% случаев LHON в европейской популяции вызываются тремя мутациями риска: 3460G>A , 11778A>G и 14484T>C [3]. В данной работе разработана тестовая система по определению уровня гетероплазмии мутации 11778A>G, для этого в плазмидные векторы pUC19 были клонированы фрагменты гена, содержащие сайт с мутацией p.11778G и дикий тип p.11778A. Полученные векторы смешивались в эквимолярном соотношении для имитации гетероплазмии с шагом 10%. Основная идея метода капельной цифровой ПЦР (кцПЦР) заключается в амплификации сверхмалого количества ДНК с последующим анализом количества амплифицированой в реакции ДНК «по конечной точке». Реакционная смесь кроме матрицы ДНК включает коммерческую ПЦР-смесь, олигонуклеотидные праймеры и гидролизуемые пробы (TaqMan probe) (проба на мутацию с флуорофором FAM и проба на дикий тип с флуорофором на HEX) [4], далее реакционная смесь разделяется в специальном масляном растворе на 15-25 тыс. капель и проводятся стандартные циклы амплификации. Регистрация сигнала флуоресценции производится по конечной точке с использованием специального модуля, работающим по принципу проточного цитофлуориметра по двум каналам детекции FAM и HEX. На рисунке 1 показаны плоты распределения капель, указывающие на специфичность взаимодействия гидролизуемых проб с соответствующими матрицами. Дальнейшая работа будет сосредоточена на определении минимального порога уровня гетероплазмии, то есть определения чувствительности метода.

Рисунок 1 *– Плоты распределения капель кцПЦР в зависимости от состава ДНК матрицы*



Литература:

1. *Ylikallio E., Suomalainen A. Mechanisms of mitochondrial diseases// Ann. Med. 2012.Vol. 44. P.41–59.*
2. *Мазунин И.О., Володько Н.В., Стариковская Е.Б., Сукерник Р.И. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека// Молекулярная биология. – 2010. –Т.44, №. 5. - С. 755–772.*
3. *Mazunin I.O., Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Sukernik R.I. Mitochondrial genome and human mitochondrial disease//Molecular biology. – 2010. –Vol. 44, №. 5. - P. 755–772.*

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 57.088.1

THE METHOD ddPCR TO DETERMINE THE HETEROPLASMY OF MITOCHONDRIAL DNA MUTATION IN EXAMPLE MUTATION 11778A>G

Sofronova Y.K., Mazunin I.O.

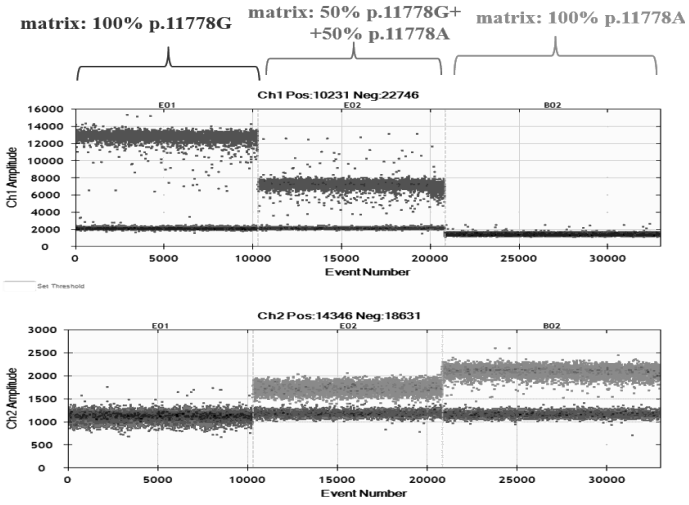
Immanuel Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation 236000, University street 2
e-mail: sofronovaYK@yandex.ru

In this paper showed a possibility of using ddPCR to detect heteroplasmy mitochondrial DNA and counting absolute number copies of mutant molecules mitochondrial DNA per cell.

Key words: mtDNA, mutations, heteroplasmy, ddPCR

Except nucleus, only the mitochondria have their own small DNA molecules in human cells. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) can lead to reduction of power generation and to death of cells. There is a wide range of hereditary diseases associated with mutations in mtDNA. Because in the cell exist multiple copies of mtDNA this leads to the heteroplasmy phenomenon, i.e. when a mixture of various mtDNAs (with mutations and without them) is found in one cell. The heteroplasmy of mtDNA mutation is one of the main criteria for definition pathogenic mutation. A disease may clinically manifest and progress upon reaching a certain quantitative level of mutant mtDNA, known as a threshold effect [1]. Current methods reveal mutant mtDNA when its level comprises 5-10% of total mtDNA, which is sufficient for performing early diagnostics of mitochondrial disorders [2]. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) is caused by the mutations in the structural genes of mtDNA. Clinically LHON characterized by degeneration of retina ganglionic layer and optic nerve atrophy. About 95% of LHON in the European populations caused by the three mutations: 3460G> A, 11778A> G, and 14484T> C [3]. In this paper was designed test system for detection heteroplasmy of mtDNA. For this, fragments from the gene containing a region with mutation (p.11778G) and the wild type (p.11778A) variants were cloned into pUC19 plasmid. These vectors were mixed in an equimolar ratio to simulate heteroplasmy in 10% increments. The basic idea of droplet digital PCR (ddPCR) is to amplify minor quantities of DNA with following analysis of amplified DNA in the reaction mixture on «endpoint.» Except matrix of DNA the reaction mixture comprised a commercial PCR mixture, oligonucleotide primers and hydrolyzed probes (TaqMan probes) (probe for the mutation with a fluorophore FAM and probe for the wild-type with a fluorophore HEX) [4]. Further the reaction mixture was separated in a special oil solution which contained 15-25 thousands of droplets and was amplified on the standard amplification cycles. Registration of the fluorescence signals was produced using a special module, working on the principle of cytofluorometry with detection of signals on the two channels FAM and HEX. On the figure 1 shows plots of the distribution of droplets, indicating the specificity of the interaction hydrolyzed probes with corresponding matrix of DNA. Further research work will be concentrated on the definition of a minimum threshold for determining level heteroplasmy of mutation, i.e. determining the sensitivity of the method.

Figure 1 *- Plots of the distribution of droplets after ddPCR*



BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

References:
1. *Ylikallio E., Suomalainen A. Mechanisms of mitochondrial diseases// Ann. Med. 2012.Vol. 44. P.41–59.*
2. *Мазунин И.О., Володько Н.В., Стариковская Е.Б., Сукерник Р.И. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека// Молекулярная биология. – 2010. –Т.44, №. 5. - С. 755–772.*
3. *Sofronova J.K., Ilinsky Y.Y., Orishchenko K. E., Chupakhin E.G., Lunev E.A., Mazunin I.O. Detection of Mutations in Mitochondrial DNA by Droplet Digital PCR// Biochemistry. 2016. Vol. 81. № 10. P. 1031-1037.*

УДК 60:001.89

РАЗРАБОТКА НАНОРАЗМЕРНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Лазурина Л.П.

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск, Россия
305010, Курская обл., Курский р-н, п. Юбилейный, ул. Российская, д. 45
e-mail: kafbht@yandex.ru

Синтезированы наноразмерные субстанции с целью введения их в транспортную систему доставки на основе биополимеров. Данные разработки безусловно актуальны, так как способствуют созданию новых лекарственных форм, уменьшают вероятность побочных эффектов, а пролонгированность их действия упрощает процедуру лечения.

Ключевые слова: наночастицы, биополимеры, биологически активные вещества, производные 5-нитроимидазола, транспортная система доставки

В последнее время в ряде областей биохимии, биотехнологии и т.д. позволили получить и изучить большое количество различных биологически активных веществ, но во многих случаях возможность их использования недостаточна, а эффективность далека от максимальной. Низкомолекулярные лекарственные субстанции быстро выводятся или метаболизируют в организме, имея низкую проникающую способность через клеточные мембраны, что для достижения терапевтического эффекта требует увеличения их дозы или многократного введения.

Необходимо отметить, что большинство биологически активных веществ плохо растворимо в водных средах, что является основным недостатком. Однако они могут быть решены за счет включения биологически активных веществ в наноразмерные системы доставки на основе биополимеров. Поэтому получение и разработка новых наноразмерных транспортных систем на основе биополимеров с биологически активными веществами является актуальной проблемой.

Целью данной работы является разработка и получение наноразмерной системы доставки биологически активных субстанций на основе биополимеров.

В качестве биологически активной субстанции использовались производные 5-нитроимидазола, а в качестве полимеров-носителей водорастворимые производные целлюлозы, поливиниловый спирт, поливинилпироллидон, а также их сочетания между собой.

Разработана методика и технология получения наноразмерной системы доставки производных 5-нитроимидазола на основе биополимеров. Установлена значимая противомикробная активность изучаемых наноразмерных систем в отношении таких микроорганизмов, как *Proteus vulgaris ATCC 4636, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Bacillus subtilis ATCC 6633, Candida albicans NCTC 2625* и *Pseudomonas aeruginosa ATCC 2753,* что позволяет рекомендовать их для дальнейшего изучения с целью расширения ассортимента противомикробных средств.

UDC 60:001.89

DEVELOPMENT OF NANOSCALE SYSTEM OF DELIVERING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Lazurina L.P.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

Kursk state medical university, Kursk, Russia
45, Rossiyskaya str., township of Yubileyniy, Kursk district, Kursk region, 305010
e-mail: kafbht@yandex.ru

Nanoscale substances have been synthesized for their introduction into the transport system of delivery on the basis of polymers. The developed system is topical since it contributes to creating new dosage forms, reduces the probability of side effects, and makes patients' treatment easier due to its prolonged action.

Key words: nanoparticles, biopolymers, biologically active substances, 5-nitroimidazole derivatives, transport system of delivery

Recently some biological and biochemical investigations have enabled to obtain and study a great number of different biologically active substances, but the possibility of their use is largely insufficient and their efficiency is far from being high. Low-molecular medical substances are readily eliminated from the body or metabolized having the low ability to penetrate through cell membranes that requires the increase in dosage or multiple introductions to achieve therapeutic effect.

It should be mentioned that the majority of biologically active substances are poorly soluble in water that is their principle disadvantage. However, this problem can be solved by introducing biologically active substances into the nanoscale systems of delivery on the basis of polymers. It proves that the development and obtainment of new nanoscale transport systems on the basis of polymers with biologically active substances is quite a topical problem.

The purpose of the study is the development and obtainment of a new nanoscale system of delivering biologically active substances on the basis of biopolymers.

5-nitroimidazole derivatives have been used as a biologically active substance, and water-soluble cellulose derivatives, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone and their combinations have been used as polymer carriers.

The techniques of obtaining nanoscale systems of delivering 5-nitroimidazole derivatives on the basis of biopolymers have been developed. The significant antimicrobial activity of the nanoscale systems investigated with regard to microorganisms like *Proteus vulgaris ATCC 4636, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Bacillus subtilis ATCC 6633, Candida albicans NCTC 2625,* and *Pseudomonas aeruginosa ATCC 2753* has been revealed that conditions the need for their further investigation for expanding the range of antimicrobial drugs.

.....

УДК 577

СЕЛЕКЦИЯ АПТАМЕРОВ К В2-МИКРОГЛОБУЛИНУ МЕТОДОМ CE-SELEX ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПО ДЛИНЕ ДНК-БИБЛИОТЕК

Харичкина И.И., Харичкин А.С., Панфилов В.И., Жаббарова А.Ш.

Российский химико-технологический университет им. Менделеева Д. И.,
Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20 , корп. 1
irinaaristova@list.ru

В данной работе представлен опыт получения аптамеров к белку β2-микроглобулину, который является маркером для различных заболеваний из пула различных по длине ДНК-библиотек. Селективные аптамеры к белку β2-микроглобулину получены методом CE-SELEX.

Ключевые слова: аптамер, биомаркер, CE-SELEX.

В настоящее время проблема успешного прогноза в лечении и диагностики большинства заболеваний является наиболее актуальной. В этой связи, в последнее время развивается технология получения коротких олигонуклеотидов, называемых аптамерами. Аптамеры часто называют искусственными антителами, так как они являются их аналогами, обладают высокой специфичностью и имеют ряд существенных преимуществ [1].

В качестве мишени для получения аптамеров выбрали белок β2-микроглобулин (β2m), который является маркером для различных заболеваний. Аптамеры к белку β2m получали методом CE-SELEX. В каждом цикле комплексы олигонуклеотидов с мишенью отделяли от несвязавшихся молекул с помощью

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

капиллярного электрофореза в нативных условиях.

В качестве исходного олигонуклеотидного пула использовали ДНК-библиотеки, содержащие последовательности, приведенные в таблице 1.

Таблица 1. *– Нуклеотидная последовательность ДНК-библиотек.*

(1)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)20-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'
(2)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)30-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'
(3)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)40-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'
(4)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)50-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'
(5)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)60-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'

Обогащенную дцДНК-библиотеку, полученную в каждом цикле CE-SELEX, клонировали и секвенировали. После отбора аптамеров с (1) ДНК-библиотекой и анализа индивидуальных клонов определили 6 уникальных последовательностей олигонуклеотидов [2]. А также было установлено, что для отбора методом CE-SELEX достаточно проведения 4 циклов.

Далее был проведен повторный отбор аптамеров из библиотеки (1) к белку β2m и после анализа индивидуальных клонов, установлено, что две последовательности полностью совпали, а у других были идентичные участки по 6-8 нуклеотидов (нт) в вариабельной части.

Также были проведены отборы из библиотек (2)-(5) и после анализа последовательностей установлены идентичные участки длиной от 6 до 10 нт.

В итоге были отобраны аптамеры к белку-мишени β2m из различных по длине библиотек, которые содержали в себе идентичные участки от 6 до 10 нт, что говорит о высокой специфичности отобранных апатмеров. Также было установлено минимальное количество циклов для отбора аптамеров методом CE-SELEX, которое равно 4.

Литература:
1. *Correa-Velloso J. C., Nascimento I.C., Nery A.A., Ulrich H. Impact of aptamer Technology on Diagnostics, biotechnology, and therapy. // Current Develop. In Biotech. and Bioengineering. – 2016. - № 6. – P. 125-142.*
2. *Харичкина И.П., Харичкин А.С., Панфилов В.И., Жаббарова А.Ш., Кузнецов П.Е. Отбор аптамеров к маркеру различных заболеваний β2-микроглобулину методом CE-SELEX // AUDITORIUM. – 2016. - № 3(11). – С. 6-15.*

.....

UDC 577

SELECTION APTAMERS TO BETA2-MICROGLOBULIN BY CE-SELEX OF VARIOUS DNA LIBRARIES

Harichkina I.I., Harichkin A.S., Panfilov V.I., Zhabbarova A.S.

Russian Chemical-Technological University. DI Mendeleev, Moscow, Russia
125480, Moscow, Geroev Panfilovtsev st., 20.
irinaaristova@list.ru

This paper presents the experience of obtaining aptamers to protein .beta.2-microglobulin, which is a marker for various diseases from a pool of different length DNA libraries. Selective aptamers to protein β2-microglobulin were obtained by CE-SELEX.

Key words: aptamer biomarker, CE-SELEX.

Currently, the problem of successful prediction in the treatment and diagnosis of many diseases is the most important. In this regard, recently developed technology for producing short oligonucleotides called aptamers. Aptamers are often called artificial antibodies, since they are their counterparts have high specificity and have a number of significant advantages [1].

The target for protein aptamers selected β2-microglobulin (β2m), which is a marker for various diseases. Aptamers to protein β2m received CE-SELEX method. In every cycle oligonucleotide complexes were separated

from unbound target molecules by capillary electrophoresis in native conditions.

The starting pool of oligonucleotide libraries using DNA containing a sequence shown in Table 1.

Table 1 *- The nucleotide sequence of the DNA libraries.*

(1)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)20-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'
(2)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)30-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'
(3)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)40-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'
(4)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)50-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'
(5)	5'-ATGTCCAGCGTCAGGTCCG-(N)60-CGCAGCAATAGCCAAGTCATT-3'

dsDNA enriched library prepared every CE-SELEX cycle, cloned and sequenced. After selection of aptamers with (1) a DNA library and analysis of individual clones identified six unique oligonucleotide sequences [2]. And it was also found that the method for selecting CE-SELEX enough of 4 cycles.

Further, the repeated selection from a library of aptamers (1) to a protein β2m and after analysis of individual clones revealed that two completely coincided sequences, and other portions are identical 6-8 nucleotides (nt) in the variable portion. Also, libraries of selections were carried out (2) - (5) and, after sequence analysis of the identical portions are set in length from 6 to 10 nt.

As a result, it has been selected aptamers to the target protein β2m varying in length from libraries that contained the identical portions from 6 to 10 nt, suggesting high specificity apatmers selected. It was also established minimum number of cycles for aptamer selection by CE-SELEX, equal to 4.

References:
1. Correa-Velloso J. C., Nascimento I.C., Nery A.A., Ulrich H. Impact of aptamer Technology on Diagnostics, biotechnology, and therapy. // Current Develop. In Biotech. and Bioengineering. – 2016. - № 6. – P. 125-142.
2. Harichkina I.P., Harichkin A.S., Panfilov V.I., Zhabbarova A.S., Kuznetsov P.E. The selection of aptamers to a marker of various diseases β2-microglobulin by CE-SELEX // AUDITORIUM. - 2016. - № 3 (11). - P. 6-15.

.....

УДК 606:61+579.6

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ-ГИДРОЛАЗ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ГРИБА *ASPERGILLUS ORYZAE* ШТАММ 55

Володина Е. В., Топкова О.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А
e-mail: lvolod28@gmail.com

Мицелиальный гриб *Aspergillus oryzae* является перспективным продуцентом гидролитических ферментов: кислой и нейтральной протеаз, α-амилазы и липазы, которые используются для заместительной терапии ферментной недостаточности. В настоящей работе изучено влияние состава питательных сред, концентрации посевного материала и времени ферментации на биосинтез комплекса ферментов-гидролаз грибом *A. oryzae* [1,2].
Ключевые слова: *Aspergillus oryzae*, глубинное культивирование, кислая протеаза, α-амилаза, регуляция биосинтеза, лекарственные препараты для заместительной терапии ферментной недостаточности.

Работа посвящена подбору условий при глубинном культивировании гриба *A. oryzae,* штамм 55 для достижения максимального выхода комплекса ферментов-гидролаз: кислой протеазы и α-амилазы. Изучено влияние азотного питания: органического (в форме гидролизатов соевой муки и мочевины) и минерального (в нитратной и аммонийной форме), источника углерода (мелассы и лактозы при замене глюкозы), а также солей железа, цинка, кобальта, кальция и магния в различных концентрациях. Установлено, что для одновременного повышения уровня биосинтеза кислой протеазы и α-амилазы следует использовать

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

питательные среды, содержащие соевую муку в качестве органического компонента азотного питания, а также гидрофосфат аммония в концентрации 0,1%. Показано, что большинство изученных солей не оказало позитивного влияния на биосинтез кислой протеазы за исключением сульфата магния. Максимальный эффект достигается при концентрации сульфата магния 0,1%. Внесение в состав питательной среды сульфата железа (II) в минимально изученной концентрации 0,005% способствует увеличению синтеза α-амилазы. Показано, что культивирование продуцента можно проводить без специальной подготовки посевного материала. Подобрана оптимальная концентрация споровой взвеси для засева ферментационной ПС и время культивирования (72 часа). Методами математического планирования эксперимента по схеме ортогональных прямоугольников проведена оптимизация процесса одновременного биосинтеза кислой протеазы и α-амилазы по пяти факторам (глюкоза, крахмал, соевая мука, кукурузный экстракт, аммоний сернокислый). Полученные данные могут быть использованы для разработки биотехнологии получения лечебных препаратов для заместительной терапии ферментной недостаточности.

Литература:
1. *Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Изд. «Элеватор», 2010. – 168 с.*
2. *Ковалева К.А. Ферментные препараты в гастроэнтерологической практике // РМЖ. Болезни органов пищеварения. – 2008. – Т.10. – № 2. – С. 76-79*
3. *Штамм гриба Aspergillus oryzae – продуцент кислых и слабокислых протеаз, амилолитических и цитолитических ферментов: пат. 2070921 Российская Федерация: МПК C12N1/14, C12N9/58 / Л.В. Римарева, Т.Б. Милюкова, М.Б. Оверченко, В.В. Трифонова, Б.А. Устинников. – № 93050097/13 заявл.19.10.1993, опубл. 27.12.1996.*

.....

UDC 606:61+579.6

REGULATION OF BIOSYNTHESIS OF THE ENZYME-HYDROLASES AT SUBMERGED CULTIVATION ASPERGILLUS ORYZAE STRAIN OF 55

Volodina E.V., Topkova O.V.

FSEI of HE "Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy" Russian Federation Ministry of Health
197376, St. Petersburg, street Prof. Popov, building 14, let. A
e-mail: lvolod28@gmail.com

Filamentous fungus *Aspergillus oryzae* is a perspective producer of hydrolytic enzymes: acidic and neutral proteases, α-amylase, and lipase which are used for enzyme replacement therapy failure. In this paper, we study the effect of composition of the nutrient medium, the concentration of the inoculum and fermentation time on the biosynthesis of complex-hydrolase enzymes the fungus *A. oryzae* [1,2].

Key words: *Aspergillus oryzae*, submerged cultivation, protease, amylase, regulation of biosynthesis, medications for replacement therapy enzymatic failure.

Research is devoted to the condition selection at submerged cultivation of the fungus A. *oryzae* strain of 55 in order to achieve maximum output of the complex-hydrolase enzymes, acid protease and alpha-amylase. Influence of nitrogen nutrition was researched: organic (in the form of hydrolysates of soyameal and urea) and minerals (in nitrate and ammonium form), carbon source (molasses and lactose with replacement of glucose) as well as salts of iron, zinc, cobalt, calcium and magnesium in the various concentrations. It was established that for solidary increment in activity enzymes acid protease and α-amylase, nutrient mediums containing soyameal and ammonium hydrophosphate in a concentration of 0.1% should be used. It was found that the most of the studied salts didn't have a positive effect on the biosynthesis of acidic protease except magnesium sulfate. The maximum effect is obtained at a concentration of 0.1% magnesium sulfate. Addition to the nutrient medium of iron sulfate (II) in a minimum concentration of 0.005% has a positive effect on the biosynthesis of α-amylase. It is shown that submerged cultivation can be carried out without any special preparation of inoculum. It was selected the optimal concentration of spore suspensions and fermentation time (72 hours). By the methods of mathematical experimental planning acoording to the orthogonal rectangle scheme was led the process optimization of solidary biosynthesis acid protease and α-amylase by five aspects (glucose, amylum, soya-bean flour, corn-steep extract, ammonium sulfurous). Resulting data can be used for development biotechnologies in receiving medicinal preparation for replacement therapy enzymatic deficiency. These results provide a useful for medicinal products for replacement therapy enzymatic deficiency.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

References:
1. *Gracheva I.M., Krivova A.Y. The technology of enzyme preparations – Moscow, 2010. – 168 p.*
2. *Kovaleva K.A. Enzyme preparations in gastroenterological practice // Diseases of the digestive system. - 2008. - T.10. - № 2. - 76-79 p.*
3. *The strain of the fungus Aspergillus oryzae – producer of acidic and weakly acidic proteases, amylolytic and cytolytic enzymes: pat. 2070921 Russian Federation: IPC C12N1/14, C12N9/58 / L. V. Rimareva, T. B., Milyukova, M. B. Overchenko, V. V. Trifonov, B. A. Stennikov. N 93050097/13 appl.19.10.1993, publ. 27.12.1996.*

УДК 547.415.5:547.426.221.1:577.352.4

ТЕХНОЛОГИИ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Т. Кабилова[1], О. Марков1, Д. Гладких[1], А Филатов[1], Е. Черноловская[1], Е Шмендель[2], М. Маслов[2], и М. Зенкова[1]

[1] Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, проспект академика Лаврентьева, 8, 630090 Новосибирск, РФ.
[2] Институт тонких химической технологий, Московский технологический университет, проспект академика Вернадского, 86, 119571, Москва, РФ.

Одной из задач генной терапии является создание стабильных и безопасных невирусных транспортных систем для доставки терапевтических нуклеиновых кислот (НК) в клетки мишени, обладающих эффективностью близкой эффективности вирусных векторов. Среди невирусных систем доставки особое внимание привлекают катионные липосомы. Положительно заряженные комплексы, состоящие из катионных липосом и НК (липоплексы) способны связываться с плазматической мембраной клетки и проникать в клетку путем эндоцитоза. Однако, широкое применение катионных липосом в качестве векторов для доставки НК ограничено вследствие невысокой эффективности доставки. Концепция модульных систем для доставки НК (MGDS) появилась около 10 лет назад как парадигма для синтетических невирусных систем доставки. В MGDS НК сконденсированы в липоплексы, состоящими из различных по заряду и по функциям липофильных модулей, которые обеспечивают сохранность комплекса в биологических средах, его взаимодействие с рецепторами на поверхности клетки и внутриклеточную локализацию и транспорт.

В настоящей работе мы представляем MGDS на основе коровых липосом 2X3-DOPE, описанных ранее, и серии новых липоконъюгатов, снабженных адресующим модулем (D-манноза, остаток фолиевой кислоты, D-галактоза), для направленной доставки НК *in vitro* и *in vivo*.

Маннозилированные MGDS содержали 2.5%, 5% или 10% липоконъюгата (ЛК) диалкилглицерина и D-маннозы, соединенных через сукцинильный или диэтилскватратный линкеры в составе коровых липосом. Эти MGDS были использованы для доставки НК, кодирующих опухоль ассоциированные антигены, в дендритные клетки (DCs). Мы показали, что включение в состав MGDS 10% маннозилированного ЛК приводит в значительному повышению эффективности доставки РНК и ДНК в DCs in vitro, эти же MGDS способны доставлять НК в DCs *in vivo* и индуцировать *in vivo* генерацию опухоль-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов с повышенной активностью.

Рецепторы фолиевой кислот (FRs) – поверхностные маркеры различных раковых клеток. Мы показали, что MGDS содержащие новые ЛК фолиевой кислоты и 1,2-ди-О-дитетрадецил-*rac*-глицерина, соединенных линкерами различной степени гидрофобности и длины эффективного доставляют НК в клетки, экспрессирующие FRs. При этом MGDS с ЛК, содержащим самый длинный линкер на основе полиэтиленгликоля, наиболее эффективно доставляют различные НК в клетки *in vitro* и стимулируют преимущественное накопление НК в опухоли *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант 13-04-40181-К, гранта в поддержку научный школ НШ-7623.2016.4, Российской академии наук (Программа «Молекулярная и клеточная биология». МОВ получал стипендию Президента РФ СП-4766.2016.4.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

UDC 547.415.5:547.426.221.1:577.352.4

DESIGN OF TARGETED GENE DELIVERY SYSTEMS

T. Kabilova[1], O. Markov[1], D. Gladkikh), A. Filatov[1], E. Chernolovskaya[1], E. Shmendel[2], M. Maslov[2], M. Zenkova[1]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Lavrentiev ave. 8, 630090 Novosibirsk, Russia.
[2]Institute of fine chemical technology, Moscow Technological University, Vernadsky ave. 86, 119571 Moscow, Russia.

One of the problem of gene therapy is a development of stable and safety non-viral transport systems for delivery therapeutic nucleic acids (NA) into the target cells with efficiency equal that of viral vectors. The using of cationic liposomes as delivery vectors is one of promising approach of gene therapy. Positively charged complexes composed of cationic liposomes and NA (called "lipoplexes") are able to adsorb on plasmatic membrane of cells and to entry into them by means of endocytic pathway. However, the wide application of cationic liposomes is limited by their low efficiency and unspecific delivery into the cells. These drawbacks are linked with the existence of a number of different biological barriers for lipoplexes such as interaction with blood serum proteins, plasmatic and nucleic membranes and endosomal degradation. A concept of modular gene delivery systems (MGDS) was introduced ten years ago as an appropriate structural paradigm for synthetic non-viral vector. In MGDS nucleic acid is condensed into cationic liposomal formulations consisting of different lipophilic modules that mediate environmental and cellular receptors interactions and intracellular trafficking to overcome limiting barriers.

Here we report on the application of MGDS on the basis of core liposome 2X3-DOPE described previously and lipoconjugates equipped with a targeted module (mannose. folate, D-galactose) to perform targeted delivery of therapeutic nucleic acids.

Mannosylated MGDS containing 2.5%, 5% or 10% of lipoconjugates of dialkylglycerol connected via succinyl or diethylsquatrate linkers with D masnnose were applied to enhance delivery of NA encoding tumor antigens into dendritic cells (DCs) and enhance their immunogenicity. Obtained data clearly demonstrated that incorporation of 10% mannosylated lipoconjugate into MGDS resulted in formulation exhibited high efficacy of DNA and RNA delivery in vitro, ability to meet DCs in vivo and mediate generation of tumor-specific CTLs with enhanced activity.

Folate receptors (FRs) are cellular surface markers for various cancer cells. MGDS containing novel folate-based lipoconjugates (FCs) built of 1,2-di-O-ditetradecyl-rac-glycerol and folic acid connected by spacers of various types and lengths were shown to efficiently deliver NA into FR-expressing cells. We demonstrated that FC with the longest polyethylene glycol-based spacer, but not with hydrophobic one, provided efficient NA delivery when incorporated into MGDS. The folate-MGDS mediated targeted delivery of NA (antisense oligonucleotide, siRNA, pDNA) into the cells in vitro and stimulate preferential accumulation of NA in the tumor when applied in vivo

New bivalent neutral neogalactolipids based on spermine have been synthesized to develop effective targeted MGDS. The D-galactose moiety was chosen as a ligand to asialoglycoprotein receptors (ASGPr) of hepatocytes. Targeted MGDS provided the efficient delivery of NA into Hep G2 cells.

This research was supported by RFBR grant 13-04-40181-H, MOV was a recipient of Presidential fellowship 1619.2013.4., by the grant Scientific schools SS-7623.2016.4and by the Russian Academy of Science under the programs "Molecular and Cellular"

.....

УДК 579.61

АНАЛИЗ МУКОАДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Мошковская М.А[1], Балабушевич Н.Г.[2], Вахрушева Т.В.[3], Байкова Ю.П..[3], Гусев С.А.[3], Михальчик Е.В.[3]

[1] Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, Россия
[2] МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия
[3] ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия
119992, Москва, Малая Пироговская ул., 1А
e-mail: maruammam@gmail.com

Изучено взаимодействие лабораторных штаммов *E. coli* и изолятов *E.coli*, выделенных из кишечника пациентов с болезнью Крона, с муцином из желудка свиньи *in vitro*. Проведен анализ влияния маннозы, полиэлектролитов, окислительной модификации муцина на его сорбцию бактериями. Разработаны новые подходы для анализа мукоадгезивных свойств бактерий *E.coli*, в том числе, выделенных из микробиоты пациентов.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, муцин, болезнь Крона, адсорбция муцина.

В настоящее время отмечается всесторонний интерес к влиянию кишечной микрофлоры на здоровье и болезни человека. Появились многочисленные исследования, доказывающие воздействие кишечного биоценоза на заболевания различной этиологии. Так, при болезни Крона, в области очага воспаления выявляются скопления бактерий *Escherichia coli*, не относящихся к энтеропатогенным штаммам [1]. Одним из этапов колонизации бактериями слизистой оболочки кишечника является их адгезия к поверхности, зависящая от физико-химических свойств бактериальных оболочек [2]**.** Муцины, секретируемые бокаловидными клетками кишечника, играют роль защитного барьера между бактериями и клетками эпителия [3] и представляют собой высокомолекулярные гликопротеины, состоящие на 80% из углеводного компонента (галактоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетил-галактозамин, фукоза и сиаловые кислоты) и на 20% из белка. В составе белка преобладают серин, треонин, пролин, а также цистеин, участвующий в образовании дисульфидных связей и олигомеризации молекул. Изоэлектрическая точка муцина, благодаря наличию сиаловых кислот, находится в области pH 3-4.

Цель работы состояла в исследовании взаимодействия *E. coli* лабораторных штаммов и изолятов, полученных из кишечника пациентов с болезнью Крона, с муцином, что позволит разработать метод анализа мукоадгезивных свойств бактерий, выделяемых из микробиоты кишечника человека при различных патологиях. Бактериальные клетки инкубировали в растворе муцина (0,1мг/мл) в 0,9% NaCl или PBS и оценивали снижение концентрации муцина после осаждения бактерий, используя метод Шиффа, измерение оптического поглощения при длине волны 214 нм, 260 нм, а также с помощью высокоэффективной гель-хроматографии. Количество адсорбированного муцина зависело от концентрации бактерий и метода приготовления образцов (свежие или размороженные клетки) и подтверждалось данными флуоресцентной конфокальной микроскопии в экспериментах со свежей культурой *E.coli* и FITC-меченым муцином. Кроме того, оценивали, как зависит адсорбция муцина от присутствия в среде синтетических и природных полиэлектролитов, маннозы, а также каково влияние предварительной окислительной модификации муцина хлорноватистой кислотой (HOCl).

Сравнительная оценка способности бактерий активировать нейтрофилы в крови здоровых добровольцев in vitro до и после адсорбции муцина выявила модулирующий эффект адсорбированного муцина (в пределах 20%). Способность к адсорбции муцина *in vitro* обнаруживалась не только у лабораторных штаммов бактерий, но и у изолятов *E.coli*, выделенных из кишечника пациентов с болезнью Крона. Разработанные подходы могут быть использованы для характеристики мукоадгезивных свойств *E.coli*, выделяемых из микробиоты кишечника человека в норме и при патологии.

Работа поддержана грантом РНФ № 16-15-00258

Литература:

1. *Lapaquette P., Glasser A-L., Huett A., Xavier R.J., Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive E.coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly// Cell Microbiol. 2010. V.12. No1. P .99-113.*
2. *Volodina L.A., Zhigach A.N., Leypunsky I.O., Zotova E.S., Gluschenko N.N. The influence of physical-chemical characteristics of surface modified copper nanoparticles on E.coli cell population growth suppression and on electrostatic properties of their membranes// Biophysics. 2013. Vol. 58. № 3. P. 394-401.*
3. *Bansi R., Turner B.S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications// Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2006. Vol. 11. P. 164–170.*

UDK 579.61

EXAMINATION OF MUCOADHESIVE PROPERTIES OF *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA

Moshkovskaya M.A.[1], Balabushevich N.G.[2], Vakhrusheva T.V.[3], Baikova Ju.P.[3], Gusev S.A.[3], Mikhalchik E.V.[3]

[1] Russian Chemical Technological University named after D.I.Mendeleev, Moscow, Russia
[2] Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Department of Chemistry, Moscow, Russia
[3] Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia
Malaya Pirogovskaya, 1A, Moscow, 119992
e-mail: maruammam@gmail.com

The interaction between *E.coli* (laboratory strains and isolates from the intestine of Crohn's disease patients) and

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

mucin from porcine stomach was studied *in vitro*. The effects of mannose, polyelectrolites as well as of oxidative modification of mucin on its adsorption by bacterial cells were analyzed. New approaches to evaluate mucoadhesive properties of *E.coli* bacteria, including isolates from patients, are proposed.

Key words: *Escherichia coli, mucin, Crohn disease, mucin adsorption.*

Nowadays the influence of gut microbiota on the human health and diseases evokes great interest. Numerous studies prove microbiome's impact on diseases of various etiology. For example, E.coli, which are not enteropathogenic, are abnormally predominant on Crohn's disease ileal mucosa [1]. Colonization of intestinal mucosa by bacteria begins with their adhesion to the surface of mucosa, which depends on physical and chemical properties of bacterial cell envelopes [2]. Mucins, highmolecular weight glycoproteins consisting of 80% carbohydrates (galactose, N-acetylgalactosamine, fucose, sialic acids) and 20% protein are secreted by the goblet cells to protect epithelium from bacterial invasion [3] being. Mucin protein is rich in serine, threonine, proline and also in cysteine which is important for disulfide bond formation and protein oligomerization. Due to the presence of sialic acids the isoelectric point of mucin lies at pH3-4. The aim of the study was to examine in vitro the interaction of E.coli laboratory strains and isolates from the intestine of Crohn's disease patients with mucin in order to find approaches to characterize the mucoadhesive properties of bacteria from gut microbiome of healthy persons and patients with intestinal problems.

Bacterial cells were incubated in solution of mucin from porcine stomach (0.1mg/ml) in 0.9% NaCl or in PBS. The decrease in mucin concentration of in supernatant after the pelleting of bacteria was assayed by absorbance at 214 nm and 260 nm as well as by Schiff method and gel-filtration. The mucin adsorption depended on the concentration of bacterial cells and on the method of sample preparation (fresh or frozen/thawn culture), and was also confirmed by fluorescent confocal microscopy in experiments with fresh E.coli cells and FITC-labeled mucin. The effects of mannose, synthetic and natural polyelectrolites and of HOCl-induced oxidative modification of mucin were assessed. It was also shown that there was a slight modulating effect (within 20%) of adsorbed mucin on the ability of E.coli to activate the respiratory burst of human neutrophils in human blood in vitro. Not only laboratory strains of E.coli but also the isolates from the intestine of Crohn's disease patients were capable of mucin adsorbing.

These results and approaches could be helpful in evaluation of mucoadhesive properties of E.coli from human gut microbiome.

This work was supported by grant of RSF № 16-15-00258

References:

1. *Lapaquette P., Glasser A-L., Huett A., Xavier R.J., Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive **E.coli** are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly// Cell Microbiol. 2010. V.12. No1. P. 99-113.*
2. *Volodina L.A., Zhigach A.N., Leypunsky I.O., Zotova E.S., Gluschenko N.N. The influence of physical-chemical characteristics of surface modified copper nanoparticles on **E.coli** cell population growth suppression and on electrostatic properties of their membranes// Biophysics. 2013. Vol. 58. № 3. P. 394-401.*
3. *Bansi R., Turner B.S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications// Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2006. Vol. 11. P. 164–170.*

УДК 577.218

НАРУШЕНИЕ ПАМЯТИ И ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА BDNF ПРИ РАЗВИТИИ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ

Горлова А.В.[1], Павлов Д.А.[1], Зубков Е.А.[2], Иноземцев А.Н.[1], Чехонин В.П.[2]

[1]Биологический факультет, Московский Государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, 119234
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, Москва, пер. Кропоткинский, 23, 119034
e-mail: anna.gorlova204@gmail.com

Изучена динамика развития депрессивно-подобного состояния путем варьирования длительности экспозиции стрессирующего фактора – ультразвука переменных частот. Показаны последовательные измене-

ния экспрессии гена BDNF в ряде структур и корреляция наиболее выраженного спада его экспрессии с проявившимися у экспериментальных животных когнитивными нарушениями.

Ключевые слова: депрессивно-подобное состояние, память, BDNF

Увеличение случаев диагностирования клинической депрессии делает актуальным исследование молекулярных механизмов заболевания и поиск его адекватных моделей на животных. В данной работе мы использовали ультразвуковую модель депрессивно-подобного состояния, в рамках которой крысы подвергались воздействию частот 20-45 кГц, подающихся случайным образом в течение 1, 2 и 3 недель. Для обнаружения когнитивных нарушений мы провели тест «Распознавание нового объекта» и выработку условного рефлекса пассивного избегания. Нарушение памяти зарегистрировали только у животных, подвергавшихся ультразвуковому излучению в течение 3 недель. Это согласуется с представлениями о том, что нарушения памяти обычно наблюдаются при тяжелых формах депрессии. Уровень экспрессии гена BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) в гиппокампе и среднем мозге снизился уже после 1 недели ультразвукового воздействия, однако только после 3 недель воздействия нами был зафиксирован наиболее резкий спад его экспрессии в гиппокампе и миндалине. Таким образом, уровень экспрессии BDNF в данных структурах коррелирует с проявлением когнитивных нарушений у экспериментальных животных. Полученные результаты позволят расширить представления о роли BDNF в развитии депрессии и депрессивно-подобного состояния.

UDC 577.218

MEMORY IMPAIRMENTS AND CHANGES OF BDNF GENE EXPRESSION IN DEPRESSIVE-LIKE STATE DEVELOPMENT

Gorlova A.V.[1], Pavlov D.A.[1], Zubkov E.A.[2], Inozemtsev A.N.[1], Chekhonin V.P.[2]

[1]Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, Leninskie gory 1-12, 119234
[2]Federal State Institution "Serbsky Federal Medical Research Center of Psychiatry and Narcology"of the Russian Ministry of Health. Moscow, Russia, Kropotkinsky pereulok, 23, 119034
e-mail: anna.gorlova204@gmail.com

The dynamics of depressive-like state development has been studied by changing the exposure time of stressing factor – ultrasound of altering frequencies. We showed changes of the BDNF gene expression in a number of structures and correlation of its most significant decline with manifested cognitive impairments in experimental animals.

Key words: depressive-like state, memory, BDNF

Increase of diagnosed cases of major depressive disorder intensified investigation of its molecular mechanisms and search of adequate animal models of depressive-like state. In our work we used an ultrasound model in which rats were exposed to ultrasonic frequencies 20-45 kHz that were given randomly during 1, 2 and 3 weeks. In order to detect possible cognitive impairments we performed Object Recognition Test and Passive Avoidance learning. It appeared that only rats from the group exposed to ultrasound for 3 weeks had changes in memory functioning. These results are consistent with the idea that memory impairments are usually observed in severe forms of depressive disorder. Level of BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) gene expression in hippocampus and midbrain decreased after 1 week of ultrasound exposure, but only after 3 weeks of exposure we recorded the most significant decline of its expression in hippocampus and amygdala. Thus, the level of BDNF gene expression correlates with the manifestation of cognitive impairments in experimental animals. These findings can help to expand the knowledge of BDNF role in depression and depressive-like states.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 544.726.2

СОИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НА РАЗЛИЧНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЯХ

Пилипчук Ю.П., Грачева А.А., Глазова Н.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации
197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит.А
e-mail: Yuliya.Pilipchuk@pharminnotech.com

В настоящее время метод системной энзимотерапии (СЭТ) является одним из наиболее актуальных методов лечения заболеваний, связанных с ферментной недостаточностью. Поэтому соиммобилизация очищенных ферментов различного происхождения на мелкодисперсном носителе является перспективным направлением для создания новой лекарственной формы для СЭТ.

Ключевые слова: гидролитические ферменты, сорбционная очистка, соиммобилизация.

Анализ отечественного рынка показал, что потребность в лекарственных препаратах, содержащих гидролитические ферменты, возрастает. Поэтому актуальным является разработка, производство и применение препаратов нового поколения на основе комплекса гидролитических ферментов различного происхождения. Данные препараты не ограничиваются локальным воздействием, а способны оказывать лечебный эффект на организм в целом.

В качестве источника растительной протеазы используется экстракт подмаренника настоящего, а в качестве источника гидролитических ферментов животного происхождения – субстанция панкреатина фирмы SIGMA-ALDRICH. В связи с тем, что и экстракт подмаренника, и панкреатин представляют собой многокомпонентную систему, в которой присутствуют неактивные примеси различной структуры, то для повышения удельной активности целевых компонентов целесообразно проводить очистку от пигментных и балластных примесей. В работе производилась сорбционная очистка растительной протеазы и комплекса гидролитических ферментов животного происхождения. Очистку проводили в динамических условиях сорбционно-хроматографическим методом на сульфокатионитах и карбоксильных катионитах макропористой и макросетчатой структур: КУ-23, Биокарб А, Purolit-C115. В ходе исследования было выявлено, что сильнокислотный катионит КУ-23 не может быть использован для дальнейшей работы, так как КУ-23 диссоциирует на всем диапазоне pH. Макропористый карбоксильный катионит Purolit-C115 так же не может быть использован, так как происходит необратимое связывание биологически активных соединений с сорбентом. Для очистки был использован карбоксильный катионит Биокарб А, данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. *Выход ферментов по сорбции и десорбции на сорбенте Биокарб А.*

Выход,%	Панкреатические ферменты			Растительные ферменты
	амилаза	липаза	протеаза	протеаза
Сорбция	70	62	60	86
Десорбция	140	98	105	99

Как видно из таблицы 1, при использовании сорбента Биокарб А наблюдается высокий выход по сорбции ферментов из исходного раствора и по десорбции (высокая обратимость сорбции). После сорбционной очистки полученный элюат концентрировали и обессоливали на ультрафильтрационном мембранном модуле Vivaflow 200 фирмы «Sartorius» с различным номинальным отсечением по молекулярной массе. Далее проводилась соиммобилизация ферментов животного и растительного происхождения из соответствующего сырья на подобранном носителе. В качестве носителя использовался мелкодисперсный сорбент Биокарб А (4-5 мкм), который прошел фармакологические испытания. На подобранном сорбенте из исходного раствора во всех случаях было просорбировано более 90 % ферментов и десорбировано от 80 до 95%, что показывает эффективность подобранного сорбента для создания обратимо диссоцирующего комплекса**.** Обратимо-сорбционная иммобилизация предполагает создание новой перспективной формы лекарственных препаратов для лечения ферментной недостаточности без кислотостойкой оболочки.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

Литература:
1. Способ получения карбоксильного катионита [Электронный ресурс]. - Режим доступа: hhttp://patents.su/2-562093-sposob-polucheniya-karboksilnogo-kationita.html (дата обращения: 9.12.2016).
2. Черкасов, А.Н. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. / А.Н. Черкасов, В.А. Пасечник. - Л.: Химия, 1991.С. 240.
2. Скорпус, Р. Методы очистки белков. /Р. Скорпус. - М.: Мир,1985,С.224.

UDC 544.726.2

SOIMMOBILIZATION OF ENZYMES OF ANIMAL AND VEGETABLE RAW MATERIALS IN THE DIFFERENT POLYMERIC CARRIERS

Pilipchuk Y.P., Gracheva A.A., Glazova N.V.

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy of the Russian Federation Ministry of Health
197376, St. Petersburg, ul. Professora Popova, d. 14, Lit.A
e-mail: Yuliya.Pilipchuk@pharminnotech.com

Now the system enzymotherapy (SET) method is one of the most urgent treatment of diseases associated with enzyme deficiency. Therefore soimmobilization purified enzymes of different origin on the fine particulate carrier is a promising direction for the creation of a new dosage form for SET.

Key words: hydrolytic enzymes, sorption cleaning, soimmobilization.

Domestic market analysis has shown that the need for medicaments containing hydrolytic enzymes increases. Therefore, the development, production and use of a new generation of drugs, based on a set of hydrolytic enzymes of different origin is relevant. These drugs are not limited to local influence, and are able to exert a therapeutic effect on the body as a whole.

As a source of plant protease used Galium verum extract, as a source of hydrolytic enzymes of animal origin - substance pancreatin firm SIGMA-ALDRICH. Due to the fact that the extract and bedstraw, pancreatin and represent a multicomponent system in which there are different structures inactive impurity, to increase the specific activity of target components it is advisable to clean ballast from the pigment and the impurities. The work was carried out sorption purification plant protease and a complex of hydrolytic enzymes of animal origin. Purification was carried out under dynamic conditions Sorption-chromatographic method on sulfonic and carboxylic cation exchangers macroporous and macroreticular: KU-23, A Biokarb, Purolit-C115. The study showed that the strongly acidic cation exchanger KU-23 can not be used for further work, and KU-23 dissociates the entire pH range. Macroporous cation exchanger carboxyl Purolit-C115 can also be used as the irreversible binding of biologically active substances with the sorbent. carboxyl cation exchanger Biokarb A has been used for cleaning data presented in Table 1.

***Table 1**. Out of enzymes on the sorption and desorption on sorbent Biokarb A.*

Yield of stage,%	Pancreatic enzyme			plant enzymes
	amylase	lipase,	protease	protease
sorption	70	62	60	86
desorption	140	98	105	99

As can be seen from Table 1, when using a sorbent Biokarb A higher yield is observed for adsorption of enzyme stock solution and desorption (adsorption high reversibility). After adsorption purification obtained eluate is concentrated and desalted by ultrafiltration at a membrane module Vivaflow 200 from “Sartorius” with different nominal molecular weight cut-off. Then conducted soimmobilizatsiya enzymes of animal and vegetable origin of the relevant raw materials in the chosen media. As the carrier used Biokarb A sorbent particulate (4-5 micron) held pharmacological tests. On a chosen sorbent from the feed solution in all cases was sorbed over 90% enzymes and desorbed from 80 to 95%, which demonstrates the effectiveness of the chosen sorbent to create reversibly dissociative complex. Reversible-sorption immobilization involves the creation of a new perspective form of drugs for the treatment of enzyme deficiency without acid-proof shell.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

References:
1. A process for preparing carboxyl cation [electronic resource]. - Access: hhttp: //patents.su/2-562093-sposob-polucheniya-karboksilnogo-kationita.html (reference date: 09.12.2016).
2. Cherkasov, AN Membranes in Biotechnology and sorbents. / AN Cherkasov, VA Beekeeper. - L.: Chemistry, 1991.S. 240.
3. Skorpus, R. protein purification methods. /R. Skorpus. - M .: Mir, 1985, P.224.
soimmobilizatsiya enzymes from animal and vegetable raw materials in the different polymeric carriers.

УДК 577.112

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЭРИТРОПОЭТИН ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧАЕМЫЙ СИНТЕЗОМ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*: КЛОНИРОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ.

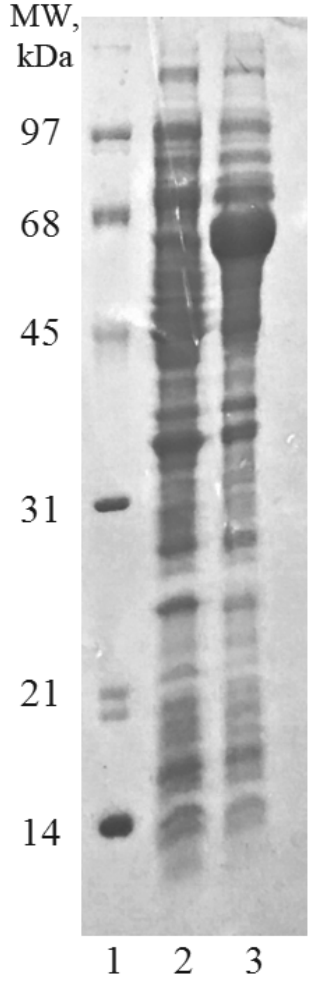
Демиденко А.В., Бартов М.С., Савина Д.М., Савин К.С., Лящук А.М., Грунина Т.М., Галушкина З.М., Соболева Л.А., Попонова М.С., Громов А.В., Лунин В.Г., Карягина А.С.

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия
123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18
e-mail: artem.ipp@gmail.com

Ген эритропоэтина человека проклонирован в составе конструкции, содержащей также ген мальтозосвязывающего белка. Продукция в штамме *Escherichia coli* SHuffle достигала 50% от суммарного белка клетки, примерно половина белка синтезировалась в растворимой форме. Разработана схема выделения нативного эритропоэтина, получаемого протеолитическим гидролизом энтерокиназой.

Ключевые слова: эритропоэтин, мальтозосвязывающий белок, экспрессия

Рекомбинантный эритропоэтин (EPO) человека, получаемый синтезом в эукариотических системах экспрессии широко используется в клинике для лечения различных форм анемии, острых поражений мозга, сердца и почек и в антираковой терапии. Недавно было показана возможность синтеза в клетках *Escherichia coli* рекомбинантного эритропоэтина, не уступающего по активности белку, полученному эукариотическим синтезом (Jeong et. al., 2014). Целью нашей работы было клонирование синтетического гена эритропоэтина в клетках *E. coli* и отработка методов очистки рекомбинантного белка. Ген эритропоэтина человека с оптимизированным для экспрессии в *E. coli* кодонным составом, клонировали в вектор pET30m в составе химерной конструкции, содержащей последовательности, кодирующие мальтозосвязывающий белок (MBP), а также спейсер из повторов глицина и серина и сайт протеолиза, гидролизуемый энтерокиназой (DDDDR), между последовательностями MBP и EPO. Были получены два варианта рекомбинантных генов, кодирующих 2 химерных белка – содержащий и не содержащий последовательность из 6-ти гистидинов на N-конце: MBP-sp-Entero-EPO и 6xHis-MBP-sp-Entero-EPO с молекулярными массами 60,0 и 61,4 кДа. При экспрессии в клетках *E. coli* SHuffle (C3029) уровень синтеза обоих вариантов белка достигал 50% от суммарного белка клетки, при этом примерно половина целевого белка синтезировалась в виде телец включений, половина – в растворимой форме (на рисунке приведен пример наработки белка 6His-MBP-sp-Entero-Epo: 1 - маркер молекулярных масс BioRad Low range, 2 и 3 - тотальный белок экспрессирующего штамма *E. coli* до и после индукции ИПТГ, соответственно). Разработаны схемы хроматографической очистки и протеолитического гидролиза получаемых рекомбинантных белков, в том числе схема с использованием в качестве сорбента для растворимой фракции MBP-содержащих химерных белков раствора крахмала вместо дорогостоящего коммерческого сорбента, что позволяет значительно снизить затраты на аффинном этапе очистки. Версия химерного белка, несущего на



N-конце олигопептид 6xHis позволяет быстро и эффективно освобождаться от N-концевого фрагмента, содержащего MBP и линкер, повышая выход целевого белка за счет сокращения хроматографических стадий очистки. Отрабатываются условия рефолдинга целевого белка для получения максимально активной формы. Отработаны условия тестирования активности эритропоэтина *in vivo* по изменению количества ретикулоцитов в крови лабораторных животных (мышей) после введения препарата по сравнению с отрицательным контролем (буфером введения) и положительным контролем (препаратом эукариотического эритропоэтина).

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 16-15-00133).

Литература:

1. *Jeong T.H., Son Y.J., Ryu H.B., Koo B.K., Jeong S.M., Hoang P., Do B.H., Song J.A., Chong S.H., Robinson R.C., Choe H. Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from E. coli. // Protein Expr. Purif. — 2014. — Vol. 95. — 211-218.*

УДК 577.112

RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN, OBTAINED BY SYNTHESIS IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS: CLONING AND DEVELOPMENT OF ISOLATION AND PURIFICATION SCHEME.

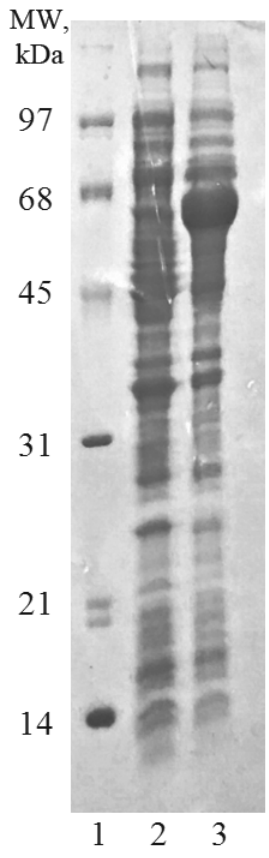
Demidenko A.V., Bartov M.S., Savina D.M., Savin K.S., Lyaschuk A.M., Grunina T.M., Galushkina Z.M., Soboleva L.A., Poponova M.S., Gromov A.V., Lunin V.G., Karyagina A.S.

N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia
123098, Moscow, Gamaleya Str., 18
e-mail: artem.ipp@gmail.com

Human erythropoietin gene as a part of the chimeric gene also containing a maltose binding protein has been cloned in *Escherichia coli* SHuffle. Production of the protein reached 50% of the total cell protein; approximately half of the protein was synthesized in soluble form. Isolation scheme for obtaining native form of erythropoietin using enterokinase hydrolysis has been developed.

Key words: erythropoietin, maltose binding protein, expression.

Recombinant human erythropoietin (EPO), obtained by synthesis in eukaryotic expression systems is widely used in clinic practice to treat various forms of anemia, acute brain, heart, and kidney injuries and in anticancer therapy. Recently the possibility of recombinant erythropoietin synthesis in *Escherichia coli* cells was shown. Activity of this protein was the same as of the protein obtained by eukaryotic synthesis (Jeong et. al., 2014). The aim of our work was cloning of synthetic erythropoietin gene in *E. coli* cells and development of methods for purification of the recombinant protein. Gene encoding human erythropoietin with codon composition optimized for expression in *E. coli* was cloned in pET30m vector as a part of the chimeric gene containing Maltose Binding Protein (MBP), glycine-serine repeats spacer and enterokinase hydrolysis site (DDDDR) encoding sequences upstream to EPO encoding sequence. Two variants of above mentioned construction were obtained, with and without N-terminal 6xHis-tag encoding sequence, producing two chimeric proteins: 6xHis-MBP-sp-Entero-EPO and MBP-sp-Entero-EPO with molecular mass of 61.4 kDa and 60.0 kDa, respectively. The level of synthesis in *E. coli* SHuffle (C3029) cells was about 50% of the total cell protein for both proteins, and about half of the target protein synthesized in a form of inclusion bodies and another half in a soluble form (an example of the 6His-MBP-sp-Entero-Epo synthesis is shown on the figure: 1 - BioRad Low range molecular mass marker, 2 and 3 - total protein of *E. coli* cells before and after IPTG induction, respectively).



BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

The schemes of the chromatographic purification and proteolytic hydrolysis of the resulting recombinant proteins were elaborated. One of them is based on soluble starch usage instead of expensive commercial sorbent for the soluble fraction of MBP-containing protein purification, which can significantly reduce the cost of the affinity purification step. Protein variant with N-terminal 6xHis oligopeptide allows quick and effective removal of the N-terminal fragment containing MBP and the Gly-Ser linker. This results in increasing yield of the target protein by reducing chromatographic purification steps. The refolding conditions of target protein are under selection to obtain the most active form. The erythropoietin *in vivo* activity test is elaborated based on change of the number of reticulocytes in the blood of laboratory animals (mice) after the EPO administration compared to the negative control (buffer injection) and positive control (sample of eukaryotic erythropoietin).

The work is supported by Russian Science Foundation (grant No. 16-15-00133).

References:
Jeong T.H., Son Y.J., Ryu H.B., Koo B.K., Jeong S.M., Hoang P., Do B.H., Song J.A., Chong S.H., Robinson R.C., Choe H. Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from ***E. coli****. // Protein Expr. Purif. — 2014. — Vol. 95. — 211-218.*

УДК 576.852+615.332

ВЛИЯНИЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗЫ КУЛЬТУРОЙ *STREPTOMYCES LAVENDULAE*

Королева А.А., Булдакова Т.В., Яковлева Е. П.

ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт- Петербург, Россия 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14
E-mail: arina.koroleva@pharminnitech.com

Биосинтез фермента холестеролоксидазы осуществляется в ферментационной среде одинакового состава: глюкоза, NH_4NO_3, дрожжи хлебопекарные прессованные, $CaCO_3$. Проведена попытка замены дрожжей хлебопекарных прессованных на альтернативный источник органического азота.

Ключевые слова: холестеролоксидаза, питательная среда, источники азота, дрожжи хлебопекарные прессованные.

Холестеролоксидаза – фермент, катализирующий реакцию окисления холестерина до холест-4-ен-3-он, со стехиометрическим образованием перекиси водорода. Полученная концентрация перекиси водорода может быть измерена и соотнесена с концентрацией холестерина. Данная реакция лежит в основе быстрого и точного метода определения уровня холестерина в сыворотке крови [1].

В качестве продуцента холестеролоксидазы на кафедре биотехнологии используют штамм *Streptomyces lavendulae*. Подбор оптимального состава питательной среды является одним из этапов работы для получения максимального выхода фермента в процессе ферментации. В ходе исследований, проведённых на кафедре биотехнологии, по подбору источников азота были выбраны следующие компоненты: дрожжи хлебопекарные прессованные как источник органического азота, NH_4NO_3 как источник неорганического азота [2].

Однако в ходе работы было обнаружено, что показатель активности фермента варьируется от опыта к опыту. Для выяснения причины такого явления было более подробно изучено влияние дрожжей на синтез фермента, поскольку данный компонент, как единственный источник органического азота, является нестандартным сырьем для питательной среды. В ходе изучения динамики потребления органического азота в процессе ферментации, было выявлено, что в большей степени происходит потребление органического азота, влияющего как на рост культуры, так и на активность холестеролоксидазы. Что свидетельствует о ключевой роли дрожжей в биосинтезе фермента. Ряд экспериментов по изучению различных дрожжевых партий на содержание аминного азота, а так же изучение их влияния на образование холестеролоксидазы дали возможность сделать вывод о том, что данный компонент питательной среды обладает таким недостатком, как нестандартность, что, по-видимому, является причиной невоспроизводимости результатов экспериментов с высокой степенью точности [3].

Для решения этой проблемы был произведен первичный поиск альтернативных источников органического азота. После анализа ряда литературных источников были выбраны: пептон, кукурузный экстракт,

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

дрожжевой экстракт. В результате экспериментов было выяснено, что такие компоненты как пептон и кукурузный экстракт не обеспечили достаточного накопления биомассы и уровня активности фермента. Использование дрожжевого экстракта как производного дрожжей позволило достичь активности холестеролоксидазы на уровне контроля. Однако значение активности сравнимое с контролем достигается за счёт активности холестеролоксидазы в нативном растворе, а не в мицелии. В то время как, при использовании дрожжей, преимущественно образуется эндофермент. Полученные данные ставят вопрос о необходимости проведения дальнейших исследований по подбору оптимального состава питательной среды [3].

Литература:
1. *Actinomycetes in biotechnology / Ed. by M. Goodfellow, S. T. Williams, and M. Mordarski. - San Diego: Academic Press, 1988. - pp. 221-223.*
2. *Булдакова Т.В. Использование альтернативных источников органического азота при биосинтезе холестеролоксидазы / Т.В. Булдакова, В. А. Колодязная // Материалы VII Международной научно-исследовательской конференции «Актуальные научные достижения – 2012» , Прага, 27 июня – 05 июля 2012 г. С.35-38.*
3. *Королева А.А. Биосинтез холестеролоксидазы культурой Streptomyces lavendulae при варьировании азотсодержащих органических компонентов питательной среды. Пояснительная записка к дипломной работе. – Санкт-Петербург, 2016. – 77 с.*

UDC 576.852+615.332

EFFECT OF NITROGEN-CONTAINING COMPONENTS OF CULTURAL MEDIUM ON CHOLESTEROL OXIDASE BIOSYNTHESIS BY STREPTOMYCES LAVENDULAE

Koroleva A.A., Buldakova T.V., Jakovleva E.P.

Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, Professora Popova str., 14A, 197376
Email: arina.koroleva@pharminnitech.com

Cholesterol oxidase catalyzes the oxidation of cholesterol to cholest-4-en-3-on with stoichiometric production of hydrogen peroxide. The resultant hydrogen peroxide can be measured and related to the initial concentration of cholesterol. This provided the basis of a fast and sensitive method of cholesterol level determination in blood serum [1].

Production of cholesterol oxidase at the Department of Biotechnology occurs by the strain of *Streptomyces lavendulae.* Optimization of composition of culture medium is required to get the maximum yield of the enzyme. Basic components of culture medium are carbon and nitrogen sources. As part of study at the Department of Biotechnology the optimal nitrogen sources were selected: baker's yeast as a source of organic nitrogen, NH_4NO_3 as a source of inorganic nitrogen [2].

However, it was found that the rate of enzyme activity varies from experiment to experiment. Effect of yeast on the enzyme activity was studied to understand the cause of this phenomenon. Because of yeast as the only source of organic nitrogen are non-standard raw materials for culture medium. The dynamics of organic nitrogen consumption during fermentation were investigated and it was found that organic nitrogen affects both the growth of culture and the cholesterol oxidase activity. It shown that baker's yeast as a source of organic nitrogen has a great effect on the enzyme activity. The effects of different batches of baker's yeast at the enzyme activity were investigated, as well as the determination of amino nitrogen content in each batch was done. As the result, yeasts are non-standard row material which is apparently the reason for non-reproducibility of experimental results with a high precision [3].

Research of alternative sources of organic nitrogen was carried out to solve this problem. Peptone, corn-steep extract, yeast extract were chosen after a*nalysis of different sources of information*. Results were as follows: components such as peptone, and corn-steep extract didn't provide sufficient biomass concentration and the level of enzyme activity. Adding to the culture medium of yeast extract allowed reaching of cholesterol oxidase activity at the level of control. However, the activity value was achieved in the supernatant, but not in the mycelium. While using yeast at the cultural medium preferably formed intracellular enzyme. This raises the question of the need for further optimization of composition of culture medium [3].

References
1. *Actinomycetes in biotechnology / Ed. by M. Goodfellow, S. T. Williams, and M. Mordarski. - San Diego: Academic Press, 1988. - pp. 221-223.*
2. *Buldakova T.V. The use of alternative sources of organic nitrogen in the biosynthesis ccholesterol oxidase / T. V. Buldakova, V. A. Kolodeznaya // Materials of VII International research conference "Actual scientific achievements -*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

2012", Prague, June 27 - July 5, 2012 г. pp. 35-38.
3. *Koroleva A. A. Biosynthesis cholesterol oxidase the culture of* ***Streptomyces lavendulae*** *by varying the nitrogen-containing organic components of the growth medium. – St. Petersburg, 2016. – 77 p.*

УДК 663.15

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОЛАКТИНА ЧЕЛОВЕКА В БАКУЛОВИРУСНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

Сорокин М.А., Суровцева М.Н., Данилюк Н.К., Рукавишников М.Ю.

ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск, Россия
630117, Новосибирск, ул Арбузова 1/1
e-mail: danilyuk@vector-best.ru

В бакуловирусной системе экспрессии получен рекомбинантный пролактин человека с уровнем продукции до 33 мг/литр культуры. Очищенный белок показывает высокую специфическую активность в ИФА на уровне 30 мМЕ/мг.

Ключевые слова: пролактин, бакуловирусная система экспрессии, Sf9.

Пролактин является пептидным гормоном, вырабатываемым клетками передней доли гипофиза. Количественное определение концентрации пролактина в сыворотке крови используется при диагностике нарушений репродуктивной функции (нарушение менструального цикла, бесплодие, нарушение потенции), а также опухолей гипофиза.

Нами была получена экспрессирующая конструкция, в которой кодирующую область кДНК пролактина человека с собственной сигнальной последовательностью клонировали в транспортный вектор pFastBac-1 под контроль промотора гена полиэдрина вируса AcMNPV. На С-конце к кодирующей области добавили кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую гибкий Gly-Ser-Gly линкер, Strep-таг и 10-his-таг. Получение рекомбинантной бакмидной ДНК и рекомбинантного бакуловируса провели согласно стандартному протоколу системы Bac-to-Bac.

Инфицированные клетки Sf9 культивировали на среде TNM-FH с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,1% сурфактанта pluronic F-68 в течение 48, 72 и 96 часов, после чего клеточную суспензию центрифугировали. Низкомолекулярные компоненты культуральной среды удаляли путём диафильтрации. Клеточный осадок лизировали в нативных условиях. Рекомбинантный белок из диализованной культуральной среды и лизированного клеточного осадка очищали при помощи хроматографии. Выход рекомбинантного белка из культуральной среды составил 8, 18 и 24 мг/л культуры при длительности наработки 48, 72 и 96 часов, соответственно. Выход рекомбинантного белка из клеточного осадка составил 10, 15 и 5 мг/л культуры при длительности наработки 48, 72 и 96 часов, соответственно. Таким образом, максимум суммарной продуктивности имел место через 72 часа после инфицирования и составил 33 мг очищенного рекомбинантного пролактина человека на литр культуры.

Очищенный пролактин, как из культуральной среды, так и из клеточного осадка, показал высокую специфическую активность в ИФА на уровне 30 мМЕ/мг, что соответствует значениям активности нативного пролактина, полученного из экстрактов гипофиза человека. Таким образом, рекомбинантный пролактин, наработанный в бакуловирусной системе экспрессии, может являться доступной альтернативой нативному белку для целей молекулярной диагностики.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

UDC 663.15

RECOMBINANT HUMAN PROLACTIN PRODUCED WITH BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR SYSTEM

Sorokin M.A., Surovtseva M.N., Danilyuk N.K., Rukavishnikov M.Ju.

ZAO "Vector-Best", Novosibirsk, Russia
630117, Novosibirsk, Arbuzova str., 1/1
e-mail: danilyuk@vector-best.ru

Recombinant human prolactin has been produced with baculovirus expression vector system with the maximum yield up to 33 mg per liter of culture. The purified protein shows high level of specific activity in ELISA at the level of 30 mIU per mg.
Key words: prolactin, baculovirus expression vector system, Sf9.

Prolactin is a peptide hormone produced by cells of the anterior pituitary. Quantitative determination of serum prolactin concentrations is used in the diagnostics of reproductive disorders (menstrual disorders, infertility, impotence), and pituitary tumors.

An expression construct has been assembled, where the coding region of human prolactin with native signal sequence has been cloned into the transport vector pFastBac-1 under the control of the polyhedrin gene promoter. At the C-terminus of the coding region the codon-optimized sequence encoding the flexible Gly-Ser-Gly linker and Strep-tag and 10-his-tag has been placed. Preparation of recombinant bacmid DNA and the recombinant baculovirus has been performed in accordance with standard protocol of Bac-to-Bac system.

Infected Sf9 cells have been grown in TNM-FH medium supplemented with 10% fetal calf serum and 0.1% surfactant pluronic F-68 for 48, 72 and 96 hours and then the cell suspension has been centrifuged. Low molecular weight components of the culture medium have been removed by diafiltration. The cell pellet has been lysed at native conditions. The recombinant protein has been purified from the dialyzed culture medium and the cell pellet lysate by chromatography. The yield of the recombinant protein from the culture medium is 8, 18 and 24 mg per liter of culture volume after 48, 72 and 96 hours of batch culturing, respectively. On the other hand the yield of recombinant protein from the cell pellet is 10, 15 and 5 mg per liter of culture volume after the same culture duration. Thus, the maximum overall prolactin production level occurs at 72 hours post infection, and is 33 mg of purified recombinant human prolactin per liter of culture.

Purified prolactin both from the culture medium and from the cell pellet shows high specific activity in ELISA at the level of 30 mIU per mg, which corresponds to the activity values of the native prolactin obtained from human pituitary extracts. Thus, recombinant prolactin produced with baculovirus expression vector system can be a useful alternative to the native protein for the purposes of laboratory diagnostics.

.....

УДК 615.012, 544.01

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО АНТИСОЛЬВЕНТНОГО ОСАЖДЕНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ МОКИСЛФОКСАЦИНА НА ОСНОВЕ ЧАСТИЦ ГИДРОКСИПРОПИЛМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ

[1] Суховерков К.В., [1] Кудряшова Е.В.,. [1] Егоров А.М.., [1] Клячко Н.Л., [1] Филатова Л.Ю.

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
Москва, Россия, 119991, Ленинские горы 1 стр. 3
e-mail: suhowerkov@yandex.ru

Разработан новый подход к улучшению фармакокинетических свойств моксифлоксацина (МФ), основанный на включении его в состав полимерных микрочастиц. Полученные частицы демонстрируют замедленное высвобождение МФ и склонность к накоплению в легких, что делает их перспективной основой для создания систем доставки противотуберкулезных препаратов

Ключевые слова: Моксифлоксацин, ГПМЦ, туберкулёз, сверхкритические флюиды

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

В последние годы фторхинолоны все шире применяются для лечения туберкулеза. Однако, как и большинство антибиотиков, фторхинолоны, не лишены побочных эффектов, выраженность которых можно снизить созданием лекарственных форм с улучшенными фармакокинетическими характеристиками. Для разработки новой лекарственной формы антибактериального препарата группы фторхинолонов, моксифлоксацина (МФ), с пролонгированным действием и с адресной доставкой предложен метод инкапсулирования лекарственной субстанции в полимерные микрочастицы с использованием сверхкритических флюидных технологий (СКФ). Инкапсулирование МФ проводили в режиме сверхкритического антисольвентного осаждения (SAS) с применением миметилсульфоксида (ДМСО) в качестве растворителя. В качестве полимера использовали гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ). Для оптимизации фармакокинетических свойств частиц варьировали массовую долю МФ (от 5 до 50%) и концентрацию полимера от 5 до 25 г/л. При использовании разработанного метода степень включения МФ в состав частиц составляла 50 – 70%. Для всех изученных систем обнаружено, что вне зависимости от состава полимерные частицы МФ, полученные методом SAS демонстрируют замедленное высвобождение препарата в физиологическом растворе при 37°С: 40-50% МФ высвобождается за первые два часа, а для полного высвобождения препарата требуется более 7 суток. Методами динамического светорассеяния (DLS) и оптической микроскопии было показано, что частицы МФ-ГПМЦ имеют размер 200 – 300 нм и не склонны к набуханию и агрегации в физиологических условиях.

Для ряда наиболее перспективных образцов полимерных микрочастиц были разработаны методики, позволяющие включить в их состав вектор для направленной доставки лекарства в легкие. В качестве специфического лиганда использовали маннозу, включенную путем нековалентных взаимодействий в состав частиц МФ-ГПМЦ. Данный углевод способен взаимодействовать с рецепторами альвеолярных макрофагов, которые являются носителями резидентной *Mycobacteria tuberculosis* и тем самым обеспечивать активное нацеливание препарата к очагу заболевания.

В опытах in vivo было показано, что при внутривенном введении крысам частицы МФ-ГПМЦ, содержащие маннозу, демонстрируют выраженную склонность к накоплению в ткани легких. Так, маннозо-содержащие частицы показывают на 35-50% большее накопление МФ, а также более длительное время удерживания в легких (в 2 раза) по сравнению с исходным МФ. Напротив накопление препарата в печени и в почках в случае МФ в составе полимерных частиц ниже (до 2-3 раз в зависимости от состава частиц) по сравнению со свободным МФ. При этом из ткани почек МФ в составе частиц выводится быстрее, чем свободный препарат.

Таким образом, в представленной работе предложен новый перспективный подход к созданию новых лекарственных форм противотуберкулезных препаратов пролонгированного действия и с адресной доставкой.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 15-13-00063

.....

UDC 615.012, 544.01

APPLICATION OF SUPERCTITICAL ANTISOLVENT PRECIPITATION METHOD FOR CREATION OF MOXIFLOXACIN PROLONGED-RELEASE DRUG FORM ON THE BASE OF HYDROXYPROPYL METHYLCELLULOSE PARTICLES

[1] Sukhoverkov K.V., [1] Kudryashova E.V.,. [1] Egorov A.M., [1] Klyachko N.L., [1] Filatova L.Y.
[1]Lomonosov MSU, Chemical Department: Moscow, Russia,
[2]Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry: Moscow, Russia
Moscow, Russia, Leninskye gory, 1 building 3, 119991
e-mail: suhowerkov@yandex.ru

A new approach for improvement of pharmacokinetic properties of Moxifloxacin (MOX) is developed. The approach is based on inclusion of MOX into polymeric microparticles. It was shown the particles concentrate in lungs and demonstrate slow liberation of MOX and this makes them a prospective base for creation of a drug delivery system for anti-tuberculosis drugs.

Key words: Moxifloxacin, HPMC, tuberculosis, supercritical fluids

Utilization of fluoroquinolones for antituberculosis therapy has significantly increased in the recent years. How-

ever the fluoroquinolones have some side effects likewise other antibacterial drugs, but their intensity may be decreased by creation of new drug forms with optimal pharmacokinetic properties. To create this form for moxifloxacin (MOX, an antibacterial medicine, member of fluoroquinolone group) a new approach was developed. The method was based on encapsulation of MOX into polymeric particles of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) by supercritical antisolvent technique (SAS) using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a solvent. For optimization of the particles' pharmacokinetic properties mass fraction of MOX and concentration of HPMC were varied from 5 to 50% and from 5 to 25 g/l respectively. The method allowed to reach a MOX degree inclusion at the level of 50 – 70%.

It was shown that for all studied system in spite of their composition, the rate of MOX liberation was lower than for free MOX under physiological conditions. Merely 40-50% liberated during the first two hours while entire liberation of MOX was reached after 7 days. The particles were not prone to aggregation and swelling and their size was 200 – 300 nm according to the data obtained by optical microscopy and dynamic light scattering examinations. The most perspective samples of the polymeric microparticles were modified by specific vector for targeted drug delivery to lungs. D-mannose incorporated in the particles by non-covalent interactions was utilized as a specific ligand for binding with D-mannose receptors of alveolar macrophages.

It was demonstrated by *in vivo* experiments that having been injected intravenously in rats the particles containing D-mannose tended to concentrate in lungs. It was found if MOX was injected in the form of particles its concentration in lungs was by 30 – 50% higher than in the case of free MOX. The retention time in lungs of MOX in the form of particles is two times bigger than for free MOX.

To the contrary, the concentration of MOX in kidneys and liver if it was injected as particles is 2 – 3 time lower compared to free MOX, while the retention time in kidneys was smaller than for free MOX.

Thus, the new prospective approach for creation of modern target drug delivery systems for anti-tuberculosis drugs was coined in the present work.

The work was supported by Russian Science Foundation grant 15-13-00063

.....

УДК 573.6.086.83

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ МИЦЕЛЛ НА ОСНОВЕ ПОЛИАМИНОКИСЛОТ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ В ОРГАНИЗМЕ

Воейков Р. В., Абакумова Т. О., Клячко Н. Л., Челушкин П. С., Чехонин В. П.

Факультет Наук о Материалах, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119192, Москва, Ломоносовский пр. 27, корп. 11
email: voeykov.r@yandex.ru

Синтезированы мицеллы на основе полилизина, проведена их загрузка противоопухолевым препаратом метотрексат, проведена модификация мицелл векторными молекулами. Показано, что векторные мицеллы быстрее интернализуются в клетки. Также показано, что введение сшивок в мицеллы увеличивает время высвобождения лекарства из мицелл.

Ключевые слова: мицеллы; полиаминокислоты; адресная доставка лекарств, лечение злокачественных опухолей.

Селективная доставка лекарств в организме исследуется многими научными коллективами по всему миру. Одними из многообещающих материалов в этой области являются полимерные мицеллы – наночастицы, состоящие из амфифильных полимерных цепей. Мицеллы обладают рядом преимуществ: относительно высокая ёмкость загрузки, стабильность и чувствительность к изменениям окружающей среды (pH и ионная сила). Особый интерес вызывают биодеградируемые мицеллы, состоящие из полиаминокислот с введением биоселективных сшивок, так как они могут быть использованы для селективного высвобождения загруженных лекарственных препаратов в целевых клетках организма.

Целью данной работы является синтез мицелл на основе полиаминокислот, их модификация векторными молекулами, а также изучение процесса введения в них и высвобождения противоопухолевого препарата метотрексат.

Для формирования мицелл готовили раствор сополимера полиэтиленгклиеоля-б-полилизина (ПЭГ-б-ПЛЛ) в воде и разводили в диметилформамиде (ДМФА), проводили модификацию полилизинового блока полимера фенилизотиоционатом (ФИТЦ). В результате образования им стабильной тиомочевиновой

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

связи с аминогруппами полилизина в полилизиновый блок вводились гидрофобные фенильные группы, что придало этому блоку амфифильные свойства и обусловило образование мицелл за счёт самоорганизации в водном растворе. Далее использовали дитиопропионовую кислоту для создания редокс-чувствительных сшивок между немодифицированными лизиновыми звеньями. В полученные частицы, как с введенными сшивками, так и без, загружался противоопухолевый препарат метотрексат (МТХ) за счёт электростатических взаимодействий между отрицательно заряженной молекулой лекарства и положительно заряженной мицеллой. Также была проведена конъюгация полученных частиц с моноклональными антителами IgG и VEGF.

Было проведено исследование физико-химических характеристик полученных частиц методом динамического светорассеяния: определение их гидродинамического диаметра и дзета-потенциала, которые составили 45 нм и +32 мВ соответственно. Также была изучена емкость и эффективность загрузки мицелл метотрексатом, а также способности к его высвобождению в зависимости от ионной силы и наличия/отсутствия сшивок. Было показано, что мицеллы, полученные на основе мПЭГ-ПЛЛ, в котором 60% лизиновых групп модифицированы фенилизотиоцианатом, способны загружать до 15 массовых % лекарства с эффективностью до 25%. При введении редокс-чувствительных сшивок снижается скорость высвобождения препарата из частиц, что может значительно повысить эффективность препарата в случае достаточно долгой циркуляции данных частиц в организме. Исследование методом ИФА показало, что антитела сохраняют активность после конъюгации с наноконтейнерами. Был проведен анализ интернализации и цитотоксичности полученных мицелл, загруженных МТХ на культуре клеток 4T1. Было показано, что в случае VEGF-векторных наногелей наблюдается преимущественное накопление в клетках по сравнению с неспецифическими аналогами. Исследования цитотоксичности полученных образцов показали, что при введении сшивок из дитиопропионовой кислоты увеличивается величина среднелетальной дозы препарата, что связано с меньшей долей свободного лекарства и с более медленной кинетикой высвобождения.

UDC 573.6.086.83

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF MICELLES BASED ON POLYAMINOACIDS FOR TARGETED DRUG DELIVERY IN THE BODY

Voeikov R. V., Abakumova T. O., Klyachko N. L., Chelushkin P. S., Chekhonin V. P.

Faculty of Materials Science, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119192, Moscow, Lomonosovsky prospect, 27, bldg. 11
email: voeykov.r@yandex.ru

Micelles based on polylysine were synthesized and loaded by anticancer drug methotrexate and modified by vector molecules. It was shown that vectorized micelles more quickly internalized into the cells. Also it was shown that using of cross-links increases time of drug release from micelles.

Key words: micelles; polyaminoacids; targeted drug delivery; cancer treatment.

Selective drug delivery in the body is studied by many research groups around the world. One of the most promising materials in this field are polymeric micelles - nanoparticles consisting of amphiphilic polymer chains. The micelles have a number of advantages: a relatively high loading capacity, stability and sensitivity to environmental changes (pH and ionic strength). Bbiodegradable micelles consisting of polyaminoacids with bioselective crosslinks are of particular interest since they can be used for the selective release of drugs in target cells in the body.

The aim of this work was the synthesis of micelles based on polyamino acids and their modification by vector molecules, as well as the study of the process of incorporating into them and release from an anticancer drug methotrexate.

In order to form micelles the water solution of co-polymer polyethylene glycol-b-polylysine (PEG-b-PLL) was prepared and diluted in dimethylformamide (DMF), polylysine modification of polylysine chains was performed by using phenylisothiocyanate (PITC). As a result of the formation of a stable thiourea bond between PITC and the amino groups of polylysine, hydrophobic phenyl groups was incorporated into polylysine what made this block amphiphilic and caused the formation of micelles due to self-organization in aqueous solution. After that ditiopropionic acid was used to create redox-sensitive cross-links between unmodified lysine chains. The resulting particles, with or without crosslinks, were loaded by anticancer drug methotrexate (MTX) due to electrostatic interactions between the negatively charged drug molecule and a positively charged micelle. Also, the conjugation

of the resulting particles was performed with monoclonal antibodies IgG and VEGF.

The study of physical and chemical characteristics of the particles was carried out using dynamic light scattering: particularly the determination of the hydrodynamic diameter and zeta potential, which were 45 nm and 32 mW, respectively. Also the loading capacity and loading efficiency of MTX into micelles was studied as well as its ability to release the drug depending on the ionic strength and the presence / absence of crosslinks. It was demonstrated that micelles obtained from mPEG-PLL, in which 60% of the lysine groups was modified by phenyl isothiocyanate, are able to load up to 15% by weight of the drug with an efficiency of 25%. In case of using of redox-sensitive crosslinks the release rate of the drug from the particles decreases, which can significantly increase the effectiveness of the drug in case of a long-term circulation of the obtained paricles in the. ELISA assay showed that the antibodies remain active after conjugation with nanocontainers. Internalization and cytotoxicity analysis of the micelles loaded with MTX was performed on the cell culture 4T1. It has been shown that in the case of VEGF-vector nanogels preferential accumulation in the cells occures compared with non-specific analogs. Cytotoxicity studies of the obtained samples demonstrated that the introduction of dithiopropionic acid cross-links into micelles increases the value of IC_{50}, which is associated with a lower part of free drug and a slower release kinetics.

УДК 615.281.9

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ ФТОРХИНОЛОНОВ С β-ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ МЕТОДАМИ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ ФУРЬЕ И КОМПЬЮТЕРНЫМ МОДЕЛИРОВАНИЕМ

Скуредина А.А., Дейген И.М., Упоров И.В., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
119296, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 3
e-mail: skuredinanna@gmail.com

Получены комплексы моксифлоксацина и левофлоксацина с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином, метил-β-циклодекстрином и сульфобутиловым эфиром β-циклодекстрином. Рассчитаны константы диссоциации комплексов, установлены их структуры и механизм связывания. Показано, что наиболее эффективное комплексообразование достигается в кислых средах.

Ключевые слова: туберкулез, фторхинолоны, β-циклодекстрины

Несмотря на прогресс в области разработки новых лекарственных средств, туберкулез остается одной из наиболее опасных бактериальных инфекций в мире. Активно ведется поиск путей повышения эффективности ряда антибиотиков, в том числе фторхинолонов, с целью совершенствования систем доставки, увеличения биодоступности и понижения терапевтической дозы.

Для достижения данной цели были получены и исследованы комплексы клинически значимых фторхинолонов левофлоксацина и моксифлоксацина с производными β-циклодекстрина: сульфобутиловым эфиром-β-циклодекстрином, 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином, метил-β-циклодекстрином. Целью работы является исследование структур комплексов и механизма их стабилизации в зависимости от типа заместителя β-циклодекстрина: гидрофобный, гидрофильный полярный и амфифильный заряженный, - с помощью компьютерного моделирования и сопоставление результатов с данными ИК-спектроскопии.

Согласно полученным константам диссоциации комплексов (таблица 1) наиболее эффективным комплексообразующим агентом для моксифлоксацина является метил-β-циклодекстрин (Kdis = 5.0(±0.3) *10-5 М), а для левофлоксацина – сульфобутиловый эфир-β-циклодекстрин (Kdis = 5.0(±0.3) *10-5 М).

Фторхинолон	Константы диссоциации комплексов, М		
	2-гидроксипропил-β-циклодекстрин	метил-β-циклодекстрин	сульфобутиловый эфир β-циклодекстрин
Моксифлоксацин	3.3(±0.3) *10-3	5.0(±0.3) *10-5	1.0(±0.3) *10-4
Левофлоксацин	1.0(±0.3) *10-3	1.0(±0.3) *10-4	5.0(±0.3) *10-5

Таблица 1. *Значения констант диссоциации комплексов моксифлоксацина и левоклоксацина с β-циклодекстринами, расчитанные по данным методов ИК-спектроскопии Фурье*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

Для более детального изучения механизма комплексообразования было произведено компьютерное моделирование всех систем. Установлено, что для всех изученных комплексов характерны гидрофобные взаимодействия между ароматическим остовом фторхинолонов и полостью β-циклодекстринов. Показано, что наиболее эффективное комплексообразование наблюдается при pH 4 за счет дополнительной стабилизации комплекса гидрофобными заместителями β-циклодекстринов с метоксигруппой и циклопропанилом для моксифлоксацина и с метильной группой для левофлоксацина. Кроме того, установлено образование электростатических взаимодействий между сульфо группой β-циклодекстрина и протонированного атома азота гетероцикла фторхинолонов.

UDC 615.281.9

THE STUDY OF THE STRUCTURES OF THE COMPLEXES OF FLUOROQUINOLONES WITH β-CYCLODEXTRINS BY FT-IR SPECTROSCOPY AND COMPUTER MODELING

Skuredina A.A., Deygen I.M., Uporov I.V., Kudryashova E.V.

Lomonosov Moscow State University, Chemical department, Moscow, Russia
119296, Moscow, Leninskie Gory 1/3
e-mail: skuredinanna@gmail.com

Complexes of moxifloxacin and levofloxacin with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, methyl-β-cyclodextrin and sulfobutyl ether β-cyclodextrin were obtained. The dissociation constants of the complexes were calculated, and their structures and mechanism of complexation were established. It is shown that the most effective complexation is achieved in acidic media.

Key words: tuberculosis, fluoroquinolones, β-cyclodextrins

In spite of the progress in the establishing new drugs, tuberculosis remains one of the most dangerous bacterial infections in the world. Seeking the ways to improve the efficiency of several antibiotics, including fluoroquinolones, are developing rapidly to improve delivery systems, increase the bioavailability and decrease the therapeutic dose.

To achieve this goal complexes of clinically relevant fluoroquinolones levofloxacin and moxifloxacin with the derivates of β-cyclodextrin: sulfobutyl ether-β-cyclodextrin, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, methyl-β-cyclodextrin have been obtained and investigated The aim of this work is to study the structures of complexes and mechanism of their stabilization depending on the type of substituted groups in β-cyclodextrin: hydrophobic, hydrophilic and amphiphilic polar charged - with the help of computer simulation and comparing these results with the data of IR-spectroscopy.

According to the estimated dissociation constants of the complexes (table 1) the most effective complexing agent for moxifloxacin is methyl-β-cyclodextrin (Kdis = 5.0(±0.3) *10^{-5} M), and levofloxacin – sulfobutyl ether-β-cyclodextrin (Kdis = 5.0(±0.3) *10^{-5} M).

Fluoroquinolones	Dissociation constants of the complexes, M		
	2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin	methyl-β-cyclodextrin	sulfobutyl ether-β-cyclodextrin
Moxifloxacin	3.3(±0.3) *10^{-3}	5.0(±0.3) *10^{-5}	1.0(±0.3) *10^{-4}
Levofloxacin	1.0(±0.3) *10^{-3}	1.0(±0.3) *10^{-4}	5.0(±0.3) *10^{-5}

Table 1. *The values of the constants of dissociation of complexes of moxifloxacin and levofloxacin with β-cyclodextrins, calculated according to the methods of FT-IR.*

For more detailed study of the mechanism of complexation computer simulations of all systems was con-

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

ducted. It was found that all studied complexes are formed by hydrophobic interaction between the aromatic fluoroquinolone core and the cavity of β-cyclodextrins. It is shown that the most effective inclusion of fluoroquinolones was observed at pH 4 due to the additional stabilization of the complex by hydrophobic substituents of β-cyclodextrins with metoxygroup and ziklopropanom for moxifloxacin and methyl group for levofloxacin. The electrostatic interactions between the sulfo group of β-cyclodextrin and protonirovanie nitrogen atom of the heterocycle of fluoroquinolones.

УДК 577.113.(7+4):547.327

ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЕ ОЛИГО-2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДЫ (2'-ОМЕ ФГО) КАК НОВЫЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕНА

Фокина А.А.[1], МакКлори Г.[2], Челобанов Б.П.[1], Буракова Е.А.[1], Вуд М.Дж.А.[2], Стеценко Д.А.[1]

[1] Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
[2] Отделение физиологии, анатомии и генетики, Оксфордский университет, Оксфорд, Великобритания
e-mail: alesya_fokina@mail.ru

Новые аналоги РНК, в которых природные фосфатные группы замещены фосфорилгуанидиновыми группами, показали терапевтически-значимый уровень коррекции сплайсинга пре-мРНК дистрофина и восстановления биосинтеза белка в мышечной ткани в мышиной in vivo модели мышечной дистрофии Дюшена при отсутствии выраженной токсичности.

Ключевые слова: антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды, пропуск экзона, коррекция сплайсинга.

Мышечная дистрофия Дюшена (МДД) – нейродегенеративная миопатия, характеризующаяся прогрессирующей дистрофией мышц, что приводит в итоге к полной потере способности двигаться и ранней смерти больного [1]. МДД является наиболее распространенной генетической болезнью, диагностируемой в детстве (~20000 новых случаев в год, 1 мальчик из ~3600). Болезнь вызывается мутациями в гене *DMD*, нарушающими биосинтез белка дистрофина – важного структурного компонента мышечных волокон. Около 40% мутаций затрагивают регион между экзонами 45 и 55 и могут быть унаследованы, но в ~35% случаев возникают спонтанно. Недостаток дистрофина, обусловленный делециями и нонсенс-мутациями в гене *DMD*, нарушающими рамку считывания, приводит к некрозу мышечных волокон и замене мышечной ткани на жировую и соединительную [2]. Влияние мутации удается компенсировать путем коррекции сплайсинга пре-мРНК дистрофина за счет пропуска экзона с мутацией с помощью антисмыслового олигонуклеотида, блокирующего сайт сплайсинга [3]. В 2016 г. для лечения МДД путем коррекции сплайсинга был одобрен первый терапевтический препарат Eteplirsen (Exondys) на основе фосфордиамидного морфолинового олигонуклеотида (PMO).

Недавно в ИХБФМ СО РАН был открыт новый класс аналогов нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО), в которых природные фосфатные группы замещены фосфорилгуанидиновыми группами, такими как, например, 1,3-диметил-2-имидазолидиниминогруппа (Dmi) [4, 5]. Мы показали ранее, что фосфорилгуанидиновые олиго-2'-О-метилрибонуклеотиды, замещенные Dmi-группами (2'-ОМе ФГО) способны вызывать пропуск экзона в культуре мышиных миобластов H2k mdx на уровне, не уступающем соответствующему PMO. Далее нами было показано, что 25-звенный антисмысловой 2'-ОМе ФГО в дозе 200 мг/кг при еженедельной внутривенной инъекции мышам линии mdx в течение 5 недель способен вызывать уровень коррекции сплайсинга *in vivo*, превосходящий таковой для морфолинового олигонуклеотида (PMO) [6]. При этом коррекция сплайсинга по уровню мРНК согласно результатам ОТ-ПЦР и накопление дистрофина по Вестерн блоттингу были отмечены не только в скелетной мышце, но и в диафрагме и, в меньшей степени, в сердце. Следует отметить, что введение 200 мг/кг 2'-ОМе ФГО не вызывало токсических эффектов *in vivo*.

Таким образом, фосфорилгуанидиновые олиго-2'-О-метилрибонуклеотиды (2'-ОМе ФГО) могут рассматриваться как перспективные кандидаты на роль терапевтических агентов для лечения мышечной дистрофии Дюшена.

При финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 15-03-06331, 15-29-01334, 16-03-01055). Синтез модифицированных олигонуклеотидов проводился за счет гранта РНФ № 15-15-00121.

Литература:
1. Flanigan K. M. Duchenne and Becker muscular dystrophies // Neurol. Clin. 2014. Vol. 32. P. 671-688.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

2. Muntoni F., Wood M. J. A. Targeting RNA to treat neuromuscular disease // Nature Rev. Drug Discov. 2011. Vol. 10. P. 621-637.
3. Wilton S. D., Fall A. M., Harding P. L., McClorey G., Coleman C., Fletcher S. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript // Mol. Ther. 2007. Vol. 15. P. 1288-1296.
4. Заявка на патент WO2016/028187A1, 22.08.2014.
5. Купрюшкин М. С., Пышный Д. В., Стеценко Д. А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот // Acta Naturae. – 2014. – Т. 6. – № . – С. 123-125.
6. Заявка на патент РФ № 2016138168, 26.09.2016.
УДК 577.113.(7+4):547.327

PHOSPHORYL GUANIDINE OLIGO-2'-O-METHYLRIBONUCLEOTIDES (2'-OME PGO) AS NEW POTENTIAL THERAPEUTICS FOR TREATMENT OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

Fokina A.A.[1], McClorey G.[2], Chelobanov B.P.[1], Burakova E.A.[1], Wood M.J.A.[2], Stetsenko D.A.[1]

[1] Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, Oxford, UK
e-mail: alesya_fokina@mail.ru

New RNA analogues, which substitute phosphoryl guanidine groups for natural phosphates, have shown therapeutic levels of splice correction of dystrophin pre-mRNA and restoration of dystrophin levels in muscle tissues in murine *in vivo* model of Duchenne muscular dystrophy without any concomitant toxicity.

Key words: antisense oligonucleotide, exon skipping, splice correction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neurodegenerative myopathy characterized by progressive muscle degeneration that leads eventually to complete loss of mobility and early death of the patient [1]. DMD is the most common genetic disease diagnosed in childhood (~20,000 new cases per year, 1 boy out of ~3600). The disease is caused by mutations in *DMD* gene, which disrupt biosynthesis of dystrophin, an important structural protein of muscle fibers. About 40% of mutations affect the region between exons 45 and 55 and can be inherited, but in ~35% of cases arise spontaneously. The lack of dystrophin due to deletions and nonsense mutations in *DMD* gene that shift the reading frame leads to necrosis of muscle fibers and replacement of muscle tissue by fat and connective tissue [2]. The effect of mutations could be alleviated by correction of splicing of pre-mRNA of dystrophin by skipping the exon with the mutation using an antisense oligonucleotide to block splicing site [3]. In 2016 FDA has approved the first drug for the treatment of DMD by splice correction Eteplirsen (Exondys), which is based on phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO).

Recently, in ICBFM SB RAS a new class of nucleic acid analogues has been discovered, namely, phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO), in which the natural phosphates are replaced by phosphoryl guanidine groups such as, for example, 1,3-dimethylimidazolidine-2-imino groups (Dmi) [4, 5]. We have shown earlier that phosphoryl guanidine oligo-2'-O-methylribonucleotides with Dmi-groups (2'-OMe PGO) can mediate exon skipping *in vitro* in the culture of murine H2k mdx myotubes at a level not inferior to the corresponding PMO. Further, we have demonstrated that weekly intravenous (iv) injections of 200 mg/kg of a 25-mer antisense 2'-OMe PGO to mdx mice for 5 weeks has afforded the level of splice correction *in vivo* that was superior to that of the corresponding morpholino oligonucleotide (PMO) [6]. Exon skipping at the mRNA level according to RT-qPCR and restoration of dystrophin biosynthesis by Western blot assay have been observed not only in skeletal muscle but also in the diaphragm and, to a lesser extent in the heart. It should be noted that iv administration of 200 mg/kg of 2'-OMe PGO to mice did not cause any toxic effects *in vivo*.

Thus, phosphoryl guanidine oligo-2'-O-methylribonucleotides (2'-OMe PGO) can be considered as promising candidates for antisense therapeutics for the treatment of Duchenne muscular dystrophy.

Authors acknowledge financial support from RFBR (grants №№ 15-03-06331, 15-04-04109, 15-29-01334, 16-03-01055). Syntheses of modified oligonucleotides have been supported by RSF grant № 15-15-00121.

References

1. Flanigan K. M. Duchenne and Becker muscular dystrophies // Neurol. Clin. 2014. Vol. 32. P. 671-688.
2. Muntoni F., Wood M. J. A. Targeting RNA to treat neuromuscular disease // Nature Rev. Drug Discov. 2011. Vol. 10. P. 621-637.
3. Wilton S. D., Fall A. M., Harding P. L., McClorey G., Coleman C., Fletcher S. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript // Mol. Ther. 2007. Vol. 15. P. 1288-1296.
4. Patent application WO2016/028187A1, 22.08.2014.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

5. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. Phosphoryl guanidines. A new type of nucleic acid analogues // Acta Naturae. 2014. Vol. 6. № 4. P. 116-118.
6. Russian patent application № 2016138168, 26.09.2016.

УДК 573.6.086.83

ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ЗАГРУЖЕННЫХ ЦИПЛАТИНОМ, ДЛЯ ДИГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Скориков А.С., Сёмкина А.С., Абакумов М.А., Гриненко Н.Ф., Чехонин В.П.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
119192, Москва, Ломоносовский пр., 27 к. 11
e-mail: alexander.skorikov@gmail.com

Получены магнитные наночастицы оксида железа, покрытого оболочкой сывороточного альбумина, имеющие низкую токсичность и высокую Т2-релаксивность. Продемонстрирована высокая емкость загрузки частиц противоопухолевым препаратом циплатин за счет иммобилизации его на поверхности, и возможность его доставки в опухолевые клетки.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, направленная доставка лекарств, контрастные агенты для МРТ.

Магнитные наночастицы (МНЧ) оксида железа являются перспективной системой для одновременной диагностики и терапии злокачественных новообразований благодаря тому, что они сочетают в себе свойства МРТ-контрастных агентов и носителей для направленной доставки химиотерапевтических препаратов в опухолевые ткани. Данная особенность открывает перспективы к реализации с помощью таких частиц подхода персонализированной медицины – определения терапевтического эффекта того или иного препарата для конкретного пациента.

Целью данной работы является разработка магнитных частиц оксида железа, которые обладали бы низкой токсичностью, высокой коллоидной устойчивостью и способностью эффективно увеличивать контраст на МРТ изображениях, а также иммобилизация химиотерапевтического препарата цисплатин на поверхности частиц для осуществления его дальнейшей направленной доставки в опухоли.

МНЧ оксида железа были получены термическим разложением ацетилацетоната железа (III) в бензиловом спирте. Покрытие частиц сывороточным альбумином (СА) осуществлялось путем его адсорбции на поверхности частиц с последующей стабилизацией покрытия глутаровым альдегидом. Гидродинамический диаметр и ζ-потенциал определялись с помощью метода динамического светорассеяния. Т2-релаксивность частиц оценивалась в экспериментах на МРТ. Концентрации Fe и Pt в образцах определялись с помощью метода атомно-эмиссионной спектрометрии. Цитотоксичность МНЧ, оценивалась в МТТ-тестах на клетках аденокарциномы 4Т1.

Полученные МНЧ оксида железа, стабилизированные покрытием СА, имеют структуру типа ядро-оболочка, что подтверждено с помощью исследования частиц методом просвечивающей электронной микроскопией с параллельным элементным анализом. Частицы устойчивы к агрегации в растворе, и демонстрируют низкую цитотоксичность, что обеспечивается наличием биосовместимого белкового покрытия. Частицы демонстрируют суперпарамагнитные свойства и имеют Т2-релаксивность, сравнимую с коммерчески доступными препаратами на основе частиц оксида железа (161 ± 4 мМ$^{-1}$с$^{-1}$). Противоопухолевый препарат цисплатин был иммобилизован на поверхности частиц за счет координационных взаимодействий с аминокислотами, входящими в состав белка. Максимальная практически достижимая емкость загрузки цисплатина составила 20% по массе. Было продемонстрировано, что после загрузки на частицы циплатин сохраняет цитотоксическое действие на опухолевые клетки, что свидетельствует о высоком потенциале применения полученной системы для доставки препарата в опухолевые клетки.

Таким образом, получены и охарактеризованы биосовместимые МНЧ оксида железа, и осуществлена их загрузка циплатином. Продемонстрировано, что частицы имеют высокую Т2-релаксивность и емкость загрузки цисплатином, а также способны доставлять его в опухолевые клетки.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 573.6.086.83

SYNTHESIS OF CISPLATIN-LOADED MAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES FOR MALIGNANT TUMORS DIAGNOSTICS AND THERAPY

Skorikov A.S., Semkina A.S., Abakumov M.A., Grinenko N.F., ChekhoninV.P.

Lomonosov Moscow State University
119192, Moscow, Lomonosovskiy pr., 27, building 11
e-mail: alexander.skorikov@gmail.com

Albumin-coated magnetic iron oxide nanoparticles, possessing low toxicity and high T2-relaxivity, were synthesized. Particles were shown to have high cisplatin loading capacity and an ability to deliver the drug into the cancer cells.

Key words: magnetic nanoparticles, targeted drug delivery, MRI contrast agents.

Magnetic iron oxide nanoparticles (MNPs) are considered a promising system for simultaneous diagnostics and therapy of malignant tumors due to the unique combination of properties of MRI contrast agents and vehicles for targeted drug delivery. This feature opens the prospects to the realization of the personalized medicine concept with the help of such particles.

The aim of this work is the development of magnetic iron oxide nanoparticles, which would possess low toxicity, high colloidal stability and ability to effectively enhance the contrast on T2-weighted MRI images as well as the immobilization of cisplatin on the surface of the particles for its targeted delivery into the tumors.

Iron oxide MNPs were synthesized by the thermal decomposition of iron acetylacetonate (III) in benzyl alcohol. Coating with serum albumin was achieved by the adsorption of protein from the aqueous solution and consequent covalent cross-linking by glutaraldehyde. Hydrodynamic diameter and ζ-potential were determined by dynamic light scattering analysis. T2-relaxivity was estimated via MRI experiments. Concentrations of Fe and Pt in the samples were measured by atomic emission spectrometry. MNPs cytotoxicity was evaluated by MTT assay on 4T1 adenocarcinoma cells.

Synthesized MNPs have core-shell structure as determined from transmission electron microscopy coupled with elemental mapping. The particles are stable in physiological buffers and have low cytotoxicity what is provided by the biocompatible protein coating. The particles show superparamagnetic behavior and have T2-relaxivity comparable to that of the commercially available iron oxide based MRI contrast agents (161 ± 4 $mM^{-1}s^{-1}$). Chemotherapeutical drug cisplatin was immobilized on the surface of the particles by coordination with amino acids contained in the protein. The highest practically achievable loading capacity constituted 20 mass %. It was shown that after the immobilization cisplatin maintains its cytotoxic properties, which is indicative of high potential of the particles as a system for delivery of the drug to the tumor cells.

.....

УДК 504.064.3, 681.586.5

СПОСОБ ФИКСАЦИИ ФЕРМЕНТА ВНУТРИ СТЕКЛЯННЫХ КАПИЛЛЯРОВ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ СЛОЕВ

Жаркова И.С, Балкаева Г.Г., Горячева И.Ю., Скибина Ю.С[1].

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, Россия.
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83
[1]ООО Наноструктурные технологии стекла, Саратов, Россия
e-mail: zharkova_i.s@mail.ru

Работа направлена на изучение влияния полиэлектролитных слоёв на сорбцию ферментов на примере пероксидазы хрена (ПХ) по технологии послойного нанесения для разработки способа контроля селективной сорбции внутри стеклянных капилляров для использования в качестве чувствительных элементов сенсоров.

Ключевые слова: фермент, пероксидаза хрена, сорбция, полиэлектролиты, стекло, капилляры.

Разработка современных биосенсорных систем позволяет предложить новые варианты анализа для целей здравоохранения и охраны окружающей среды, а также является одним из наиболее активно раз-

вивающихся направлений современной биотехнологии. Создание оптических сенсоров физических и биофизических величин - перспективная область применения капиллярных и мультикапиллярных систем [1].

Целью работы явилось изучение влияние полиэлектролитных слоёв на сорбцию белка на примере пероксидазы хрена по технологии послойного нанесения для разработки способа контроля селективной сорбции белка. Данная технолллогия позволяет создавать полимерные пленки заданной толщины, основными достоинствами которых являются простота изготовления, возможность контроля состава и морфологии пленок, а также их стабильность.

В данной работе использовали ПХ в качестве модельного соединения, а в качестве подложки для иммобилизации фермента использованы стеклянные мультикапилляры (МК), как модель фотонно-кристаллического волновода.

Использование стеклянных МК в качестве модели ФКВ обусловлено: их прозрачностью, малыми размерами и относительной дешевизной по сравнению с ФКВ. В тоже время МК присущи слабые одномодовые оптические свойства, это значи,т что излучение, попавшее в МК, будет распространяться, по большей части, вдоль оси мультикапилляра.

Пероксидаза хрена – самый популярный биоаналитический фермент, который позволяет детектировать перекись водорода и ферменты, ее производящие, кроме того, широко применяется в аналитической биохимии и биотехнологии в качестве маркера антител и различных антигенов. [2] ПХ характеризуется изоэлектрической точкой pI = 9 и проявляет максимальную активность при pH= 6–8 [3].

Предлагаемый метод был реализован, и было показано, что более эффективная сорбция ПХ наблюдается на поверхности бислоя полиэтиленимин (ПЕИ)/полистиролсульфонат (ПСС). Такой эффект объяснен тем, что поликатион ПЕИ модифицирует стеклянную поверхность, а полианион ПСС создает условия для эффективной сорбции ПХ.

Литература:

1. *Скибина Ю.С., Тучин В.В., Белоглазов В.И., Штайнмайерг Г., Бетге Й.Л., Веделль Р., Лангхофф Н. Фотонно-Кристаллические волноводы в биомедицинских исследованиях // Журн. Квантовая электроника. 2011. Т. 41, № 4. С. 284-301.*
2. *Nielsen, K.L, Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying Arabidopsis thaliana peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2 // Biochemistry. 2001. 40(37): p. 11013-11021.*
3. *Захарова Г. С.,. Упоров И. В, Тишков В. И. Пероксидаза из корней хрена: модулирование свойств химической модификацией белковой глобулы и гема // Успехи биологической химии, Т. 51. 2011. С. 37–6437*

УДК 504.064.3

681.586.5

METHOD OF FIXING THE ENZYME ON THE GLASS CAPILLARYCAPILLARY SURFACE USING POLYELECTROLYTE LAYERS

Zharkova I.S., Balkaeva G.G., Goryacheva I.Y., Skibina Y.S.[1]

Saratov State University, Saratov, Russia 410012 Saratov, Astrakhanskaya str, 83
[1]Nanostructured Glass Technology
e-mail: zharkova_i.s@mail.ru

The work is aimed onstudying the effect of polyelectrolyte layers on the sorption of enzymes on the example of horseradish peroxidase (HRP) for layering technology to develop ways to control the selective sorption.

Key words: enzyme, horseradish peroxidase, sorption, polyelectrolyte, glass capillary.

The development of new biosensor systems allows to offer new options forhealth and environmental protection, and is also one of the most rapidly developing areas of modern biotechnology. Creating of optical sensors ia a promising field of application of multicapillary systems [1].

The aim of the work is to study the effect of polyelectrolyte layers on the protein adsorption of the example of horseradish peroxidase to develop ways to control the selective protein sorption . This method allows to create a polymer film of a given thickness; the main advantage is the ease of manufacture, the possibility of controlling the composition and morphology of the films, as well as their stability.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

In this paper HRP was used as a model compound, and glass multi capillary (MC) as a matrix for the immobilization of enzymes , glass MC are transparent, have small size and relative cheapness compared to the PCF. Meanwhile an MC inherent weaknesses single mode optical property, which means that the radiation released to MC be distributed, for the most part, along the axis MC, thereby realizing the mechanism of the PCF.

Horseradish peroxidase - the most popular bioanalytical enzyme which allows detection of hydrogen peroxide and enzymes that produce it, moreover, is widely used in analytical biochemistry and biotechnology as a marker for various antibodies and antigens [2]. HRP isoelectric point is equal to 9; HRP exhibits the maximal activity at pH = 8.6 [3].

The proposed method has been implemented, and it has been shown that more effective adsorption of HRP inside glass MC was observed with the bilayer polyethylenimine (PEI) / polystyrene sulfonate (PSS). This effect is explained by the fact that the polycation PEI modifies the glass surface, and the polyanion PSS creates a layer for the HRP effective sorption.

References:
1. Skibina Yu S, Tuchin V V, Beloglazov V I, Shteinmaeer G, Betge I L, Wedell R, Langhoff N., Photonic crystal fibres in biomedical investigations // QUANTUM ELECTRON, 2011, 41 (4), 284–301.
2. Nielsen, K.L, Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying Arabidopsis thaliana peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2 // Biochemistry. 2001. 40(37): p. 11013-11021.
3. Zakharova G.S., Uporov I.V., Tishkov V.I. Horseradish peroxidase: Modulation of properties by chemical modification of protein and heme // Biochemistry (Moscow), 2011,V.76, no.13, p.1391-1401.

.....

УДК 577.17; 577.12.05

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОКАПСУЛ НА ОСНОВЕ ГАНТЕЛЕВИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТ – ЗОЛОТО

Блохина А.Д., Ефремова М.В., Мажуга А.Г., Клячко Н.Л.

Лаборатория Химического дизайна бионаноматериалов для медицинского применения, кафедра химической энзимологии, химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, химический факультет.
e-mail: blohina_96@mail.ru

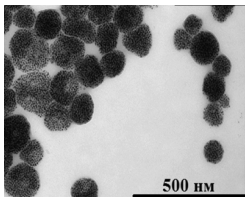
Синтезированы и охарактеризованы гантелевидные наночастицы на основе магнетит-золото. Полученные наночастицы были использованы для создания нанокапсул, предназначенных для доставки лекарств.

Ключевые слова: гантеливидные наночастицы магнетит-золото, нанокапсулы, доставка лекарств.

В последнее десятилетие рассматривается возможность использования магнитных наночастиц (НЧ) оксидов железа, в том числе, магнетита Fe_3O_4, в качестве контрастных агентов в МР-томографии, для лечения раковых заболеваний методом гипертермии, а также для транспортировки и адресной доставки лекарств. Однако НЧ магнетита сами по себе нестабильны и могут проявлять токсичность в физиологических условиях, а также легко окисляться. Выходом из этой ситуации может быть создание гибридных наноматериалов на основе магнетита и золота; выбор последнего обусловлен его стабильностью и биосовместимостью. Более того, также возможно получение более сложных систем на основе гантелевидных НЧ, в частности, контейнеров для лекарств. В связи с этим, целью данной работы является синтез и физико-химическая характеризация систем на основе гантелевидных НЧ магнетит-золото.

Гантелевидные наночастицы на основе Fe_3O_4-Au различной морфологии получали путем разложения пентакарбонила железа на поверхности НЧ Au. При этом НЧ

золота получали как отдельно (образец D-2), так и непосредственно в процессе синтеза гантелевидных структур (образец D-1). Согласно просвечивающей электронной микроскопии все полученные образцы обладают гантелевидной структурой. В случае образца D-1 (Fe_3O_4 13±1, Au 5±1) были получены НЧ магнетита с формой, близкой к сферической, образце D-2 (Fe_3O_4 23±3, Au 9±2) – с ярко выраженной кубической формой. По данным рентгенофазового анализа, образцы D-2 и D-1 обладают монокристаллической структурой магнетита. По результатам измерения магнитных свойств, образцы D-1, D-2 обладали намагниченностью насыщения 62, 80 э.м.е./г и коэрцитивной силой 13, 60 Э соответственно. Далее образцы D-1 и D-2 были использованы для синтеза капсул на основе поливинилового спирта разной молекулярной



массы. Полученные системы были охарактеризованы методами просвечивающей электронной микроскопии и динамического светорассеяния. Было показано, что размер частиц и молекулярная масса полимера влияет на способность частиц образовывать капсулы.

Рис. 1 *ПЭМ-микрофотографии капсул.*

Таким образом, в работе были синтезированы и охарактеризованы гантелевидные НЧ на основе Fe_3O_4 и Au, а также капсулы, которые можно использовать в качестве контейнеров, способных разрушаться под действием внешнего переменного магнитного поля. РНФ 14-13-0731

UDK 577.17; 577.12.05

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF THE NANOCAPSULES BASED ON DUMBBELL-LIKE MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES

Blokhina A. D., Efremova M.V., Majouga A.G., Klyachko N.L.

The laboratory of chemical design bionanomaterials for biomedical application , chemical enzymology department, faculty of chemistry, the M.V. Lomonosov moscow state university, Moscow, Russia, 119991, Moscow, GSP-1, Leninskie gory, h. 1/3, faculty of chemistry.
e-mail: blohina_96@mail.ru

We have synthesized and investigated dumbbell-like structures based on magnetite and gold nanoparticles. Obtained nanoparticles have been used to synthesize nanocapsules.

Key words: dumbbell-like magnetite-gold nanoparticles, nanocapsules, drug delievery.

Over the past decade MNPs especially magnetite NPs have been proposed to be used in therapy and diagnostics. However, magnetite NPs are toxic and unstable under physiological conditions. To solve this problem we can prepare hybrid nanomaterials based on Fe_3O_4 and Au which is stable and biocompatible. Such hybrid nanomaterials could be used as single dumbbell-like NPs or as components of more complicated structures, for example, in nanocapsules. Thereby, the goal of this work is synthesis and investigation of nanocapsules based on magnetite-gold hybrid nanoparticles.Dumbbell-like nanoparticles were prepared via the decomposition of iron pentacarbonyl over the surface of the gold followed by oxidation under air. Herewith gold nanoparticles wer obtained both separately (sample D-1) and during the synthesis (sample D-2). According to the results of TEM the samples had a dumbbell-like structure. In case of sample D-1 magnetite and gold had a spherical shape (Fe_3O_4 13±1, Au 5±1),but in the sample D-2 magnetite had and gold NPs had a spherical shape (Fe_3O_4 23±3, Au 9±2). Both Fe_3O_4 and Au phases were found on X-Ray diffractogram; in addition, NPs had a monocrystalline structure for both samples. By results of magnetic properties measurement, samples D-1, D-2 had a hysteresis loop, the value of the saturation magnetization was 62,80 emu/g and coercive force was 13,60 Oe correspondingly. Nanocapsules were made from the self-assembly of polyvinyl alcohol (PVA) with various of a molecular weight and nanoparticles of D-1 and D-2. Obtained nanocapsules were investigated by means of DLS and TEM. It is worth noting that the size of nanoparticles and the value of PVA molecular weight influence the ability of nanoparticles to form nanocapsules.

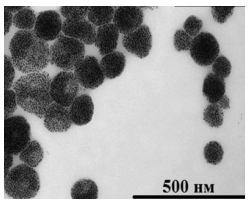


Fig. 1 *TEM of nanocapsules.*

Thus, we have synthesized and investigated dumbbell-like NPs and nanocapsules which can be used as drug carriers. Such capsules can be damaged by external alternating magnetic field. RNF 14-13-0731.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 577.17; 577.12.05

ГИБРИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ И ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ефремова М.В.[1,2], Блохина А.Д.[1,2], Наленч Ю.А.[2], Гаранина А.С.[1,2], Семкина А.С.[3], Абакумова Т.О.[3], Абакумов М.А.[2,3], Савченко А.Г.[2], Мажуга А.Г.[1,2], Клячко Н.Л.[1]

[1] Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, Москва, Россия
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 11А
[2] Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия
119049, Москва, Ленинский пр., д. 4
[3] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1
e-mail: efremova33@mail.ru

В работе получены наночастицы магнетит-золото, которые обладают высокими Т2-контрастными характеристиками, могут быть загружены терапевтическими агентами и способны накапливаться в клетках печени и предстательной железы.

Ключевые слова: наночастицы, магнетит-золото, контрастные агенты, магнитно-резонансная томография, онкологические заболевания, терапия, тераностика.

Устойчивый интерес исследователей к наночастицам (НЧ) магнетита в настоящее время связан с их потенциальным применением в терапии и диагностике, однако этому препятствует токсичность и неустойчивость наночастиц магнетита в физиологических условиях. Решить эту проблему может создание гибридных систем на основе магнетита и золота – инертного биосовместимого материала. Нами были исследованы гибридные НЧ магнетит-золото с двумя типами структуры: золото как материал оболочки (1 тип) либо в виде отдельных частиц на поверхности магнетита (2 тип).

В ходе синтеза гибридных НЧ 1 типа НЧ магнетита диаметром 9±2 нм, полученные методом соосаждения, были покрыты золотой оболочкой путем восстановления золотохлористоводородной кислоты гидрохлоридом гидроксиламина. Данные НЧ, покрытые меркаптополиэтиленгликолевой кислотой, были нетоксичны для раковых клеток предстательной железы человека, По результатам измерения релаксивности, R2 = 250-300 $мМ^{-1}с^{-1}$ для магнетита, 150-300 $мМ^{-1}с^{-1}$ для магнетита, покрытого золотой оболочкой, что превосходит аналогичную величину для коммерческих МР-контрастных агентов. Перспективным является также магнето-механический подход к терапии с использованием НЧ данного типа, имеющий в своей основе механическое влияние на различные биологические процессы с участием ферментов. В частности в переменном магнитном поле установлено достоверное снижение каталитической активности иммобилизованного на НЧ химотрипсина на 30-50%.

Гибридные НЧ 2 типа получали путем разложения пентакарбонила железа на поверхности НЧ золота. В результате были получены так называемые гантелеобразные структуры, состав которых входят наночастицы (НЧ) Fe_3O_4 сферической (образец D-1) либо октаэдрической морфологии (образец D-2) и сферические НЧ Au. Образцы D-1 и D-2 были переведены в водную фазу при помощи блок-сополимера Pluronic F127, далее в ходе МР-тестирования были получены величины релаксивности 167 и 385 $мМ^{-1}с^{-1}$, соответственно; последнее значение в два раза превышает как аналогичные характеристики коммерческих контрастных агентов.

В работе была также осуществлена селективная функционализации поверхности НЧ Fe_3O_4 в составе образца D-1 противоопухолевым лекарством доксорубицином, а поверхности НЧ Au – вектором, специфичным к раку предстательной железы. Было обнаружено, что полученные наночастицы обладали умеренной токсичностью для раковых клеток предстательной железы человека, а также заходили во внутриклеточное пространство (по данным флуоресцентной микроскопии),

Таким образом, в работе были синтезированы и охарактеризованы гибридные наночастицы на основе магнетита и золота, которые в дальнейшем могут быть использованы в биомедицине, в частности, в адресной доставке лекарств в опухолевые клетки печени и предстательной железы и магнитно-резонансной томографии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №14-13-00731, гранта №14.607.21.0132 в рамках Федеральной Целевой Программы, а также программы развития МГУ ПНР 5.13.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

UDC 577.17; 577.12.05

HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES FOR THE DIAGNOSTICS AND THERAPY OF PROSTATE AND LIVER DISEASES

Efremova M.V.[1,2], Blokhina A.D.[1,2], Nalench Yu.A.[2], Garanina A.S.[1,2], Semkina A.S.[3], Abakumova T.O.[3], Abakumov M.A.[2,3], Savchenko A.G.[2], Majouga A.G.[1,2], Klyachko N.L.[1]

[1] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Chemical Enzymology, Moscow, Russia
119991, Moscow, GSP-1, 1-11A Leninskiye Gory
[2] National University of Science and Technology «MISIS», Moscow, Russia
119049, Moscow, 4-B Leninsky prospect
[3] Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia
117997, Moscow, 1 Ostrovityanova st.
e-mail: efremova33@mail.ru

In this work magnetite-gold nanoparticles were obtained. They have high T2-contrast characteristics, can be loaded with therapeutic agents and have the ability to accumulate in liver and prostate cancer cells.

Key words: nanoparticles, magnetite-gold, contrast agents, magnetic resonance tomography, cancer diseases, therapy, theranostics.

During last decades magnetite nanoparticles (NPs) attract a deep interest of scientists due to their potential application in therapy and diagnostics. However, magnetite NPs are toxic and non-stable in physiological conditions. To solve these problems, we decided to create two types of hybrid systems based on magnetite and gold which is inert and biocompatible: gold as a shell material (first type) and gold as separate NPs interfacially bond to magnetite NPs (second type).

The synthesis of the first type hybrid NPs was carried out as follows: magnetite NPs with an average diameter of 9±2 nm were obtained by co-precipitation of iron (II, III) chlorides then they were covered with gold shell by iterative reduction of hydrogen tetrachloroaurate with hydroxylamine hydrochloride. Described NPs covered with mercapto-PEG acid were non-toxic for human prostate cancer PC-3/ LNCaP cell lines (more than 90% survived cells as compared to control) and had high R2-relaxivity rates (>190 $mM^{-1}s^{-1}$) that exceed the transverse relaxation rate of commercial MRI-contrasting agents. The magneto-mechanical approach to therapy using NPs of this type is also promising. It can be based on the mechanical effects on the various biological processes involving enzymes. In particular, the effect of alternating magnetic field on catalytic properties of chymotrypsin immobilized on NPs, notably the slowdown of catalysed reaction at the level of 30-50 % was found. The most probable reason for the observed effect is the change of active centres topology on the enzyme surface as a result of its deformation under applied forces.

Hybrid NPs of the second type were obtained by thermal decomposition of iron pentacarbonyl on the surface of gold NPs. As a result, so-called dumbbell-like structures were obtained where magnetite with spherical (sample D-1) and cubic (sample D-2) shape and spherical gold nanoparticles were connected together pairwise. Samples D-1 and D-2 were transferred into water by means of block-copolymer Pluronic F127, and then MRI-characterization was performed. R2-relaxivity rates at the level of 167 and 385 $mM^{-1}s^{-1}$ were obtained for samples D-1 and D-2, respectively; the latter value exceeds the similar characteristics of commercial contrast agents twice.

The sample D-1 was also used for the selective functionalization of Fe_3O_4 NPs surface with anticancer drug doxorubicin and Au NPs surface – with prostate cancer specific vector. Obtained nanoparticles were found to have moderate toxicity for human prostate cancer cells (LNCaP cell line) and got into the intracellular space after 45 minutes of incubation (according to fluorescence microscopy data).

Thereby, in this work magnetite-gold hybrid nanoparticles, which have a strong potential for biomedical application, particularly in targeted drug delivery to liver and prostate cells, and magnetic resonance imaging, were synthesized and characterized. That paves the way to the development of new medicine types – theranostics.

This work was supported by Grant of Russian Scientific Foundation 14-13-00731 and MSU development program 5.13. The authors knowledge financial support from Ministry of Education and Science of the Russian Federation (14.607.21.0132, RFMEFI60715X0132).

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 577.152.1: 617.723

СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА-1 В СОСТАВЕ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АГЕНТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

Клячко Н.Л.[1], Зайцева Е.А.[1], Алексашкин А.Д.[1], Еремеев Н.Л.[1], Никольская И.И.[1], Биневский П.В.[1], Чеснокова Н.Б.[2], Безнос О.В.[2], Маникам Д.[3], Нуколова Н.В.[4], Ванеев А.Н.[5], Мажуга А.Г.[1], Белова А.Б.[1], Горелкин П.В.[6], Филатова Л.Ю.[1], Кабанов А.В.[3,1], Кост О.А.[1].

[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11, химический факультет, кафедра химической энзимологии
[2] Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия
[3] University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA
[4] Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского, Москва, Россия
[5] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах, Москва, Россия
[6] ООО «Медицинские нанотехнологии», Москва, Россия
e-mail: ezaitseva2008@gmail.com

Разработаны наноформуляции рекомбинантной супероксиддисмутазы-1 человека на основе сшитых комплексов фермента с биосовместимыми полимерами. В экспериментах *in vivo* показано увеличение терапевтической эффективности полученных образцов по сравнению с исходной СОД при капельном введении для лечения воспалительных процессов в глазу.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, нанозим, наноформуляция, увеит, офтальмология

Проблема лечения воспалительных заболеваний глаз является одной из важнейших проблем офтальмологии во всем мире. Особое место по тяжести исходов и трудности лечения такого рода заболеваний занимают увеиты – воспалительные процессы в сосудистой оболочке глаза. Заболеваемость увеитами в структуре общей глазной патологии составляет 5-12%, а в структуре слепоты удельный вес увеитов составляет от 7 до 20%. Одним из подходов к лечению воспалительных процессов, сопровождающих увеиты, является использование антиоксидантов, в частности супероксиддисмутазы-1 (СОД-1).

Однако при капельном введении только 5-10% лекарственных препаратов проникает через оболочку роговицы и достигает внутриглазных тканей. Синтез СОД-содержащих полимерных наночастиц по технологии «NanoZYME™» [1] позволяет значительно усилить эффективность проникновения фермента через различные клеточные барьеры организма, в том числе и через барьер роговицы.

Представлены и обсуждаются наноформуляции СОД-1 в виде наночастиц на основе сшитого 3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионатом) комплекса рекомбинантного фермента человека с метокси-поли(этиленгликоль)-поли(L-лизин)$_{50}$ блок-сополимером, а также двуслойные наноформуляции СОД-1, покрытой последовательно протамином и сополимером метокси-поли(этиленгликоль)$_{113}$-блок-поли(L-глутаминовая кислота)$_{50}$ с последующей сшивкой полиэлектролитного комплекса глутаровым альдегидом.

На экспериментальной модели иммуногенного увеита у кроликов показано значительное улучшение ряда клинических и биохимических показателей течения болезни при местном капельном введении раствора рекомбинантной СОД-1 в составе наноформуляций по сравнению с водным раствором фермента и плацебо.

Наблюдалось значительное сокращение времени отека роговицы, отека век, уменьшение фибринозных отложений и гиперемии конъюнктивы, менее выраженное помутнение хрусталика, повышение антиоксидантной активности в слезной жидкости, снижение концентрации лейкоцитов, общего белка и активности α_2-макроглобулина в водянистой влаге глаза кроликов. Данные подтверждены гистологическими исследованиями различных тканей глаза.

Полученные результаты демонстрируют перспективность использования разработанных подходов и наноформуляций на основе СОД-1 в офтальмологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Грант РНФ 14-13-00731) в части получения наноформуляций и Министерства образования и науки (Гос. контракт № 14.N08.11.0079) в части проведения испытаний образцов фармацевтической субстанции на животных моделях.

Литература:
1. Kabanov A., Bronich T., Batrakova E., Gendelman H. Compositions for protein delivery and methods of use thereof // Pat. WO/2008/141155 A1.

УДК 577.152.1: 617.723

SUPEROXIDE DISMUTASE 1 INCORPORATED INTO POLYMERIC NANOPARTICLES AS A PROSPECTIVE THERAPEUTIC AGENT FOR THE TREATMENT OF EYE INFLAMMATION

N.L.Klyachko[1], Zaitseva E.A.[1], Aleksashkin A.D.[1], Eremeev N.L.[1], Nikol'skaya I.I.[1], Binevsky P.V.[1], Chesnokova N.B.[2], Beznos O.V.[2], Manickam D.[3], Nukolova N.V.[4], Vaneev A.N.[5], Majouga A.G.[1], Belova A.B.[1], Gorelkin P.V.[6], Filatova L.Yu.[1], Kabanov A.V.[1,3], Kost O.A.[1]

[1] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Chemical Enzymology Department, Moscow, Russia, 119991, Moscow, Lenin's Hills, 1-11
[2] Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia
[3] University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA
[4] Federal Medical Research Center of Psychiatry and Addictology, Moscow, Russia
[5] M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Materials Science, Moscow, Russia
[6] "Medical nanotechnologies" Ltd. Company, Moscow, Russia
e-mail: ezaitseva2008@gmail.com

Nanoformulations based on cross-linked complexes of recombinant human Superoxide Dismutase-1 with biocompatible polymers have been developed. *In vivo* experiments demonstrated the increased therapeutic efficacy of these nanoformulations compared to the free enzyme and placebo at topical instillations for the treatment of eye inflammation.

Key words: superoxide dismutase, nanozyme, nanoformulation, uveitis, ophthalmology

The problem of the treatment of inflammatory eye diseases is one of the most important problems in ophthalmology all over the world. Uveitis (inflammation of the choroid) is characterized by a severity of inflammation, serious complications and is difficult to treat. Uveitis incidence within common ocular pathology is 5–12%, this disease being responsible for 7–20% of blindness.

One of the approaches to the treatment of inflammatory processes at uveitis is the use of antioxidants, in particular Superoxide Dismutase-1 (SOD-1). However, only 5–10% of applied drug during topical instillations penetrates the cornea and reaches the intraocular tissues. Synthesis of SOD containing polymeric nanoparticles by means of NanoZYME™ technology [1] enables to enhance significantly the efficacy of enzyme penetration through the different cellular barriers of organism including the cornea barrier.

SOD-1 containing nanoformulations in the form of nanoparticles based on the complexes of recombinant human enzyme with methoxy-poly(ethyleneglycol)-poly(L-lysine)$_{50}$- block copolymer cross-linked by 3,3'-dithiob is(sulfosuccinimidylpropionate), as well as double layer nanoformulations of SOD-1 consecutively covered with protamine and methoxy- poly(ethyleneglycol)$_{113}$-poly(L-lysine)$_{50}$- block copolymer followed by cross-linking with glutaraldehyde, are presented and discussed.

In an experimental model of immunogenic uveitis in rabbits, the biochemical indicators of the disease were significantly improved during topical instillations of the solution of a recombinant SOD-1 incorporated into polymer nanoparticles compared to the same treatment by an aqueous solution of the enzyme and placebo.

Significant reduction of the duration of corneal and eyelid edema, decrease in the amount of fibrin clots, mitigation of lens opacity, as well as mitigation of conjunctival hyperemia, increase in antioxidant activity in the lacrimal fluid, and decrease in leukocyte count, the total protein and α_2-macroglobulin activity in the aqueous humor of rabbits were observed. The data have been confirmed by histological studies of various eye tissues.

The results obtained demonstrate the potential of nanoformulations based on SOD-1 as a promising therapeutic agent for ophthalmology.

This work was supported by Russian Scientific Foundation (Grant RSF 14-13-00731) in the part of synthesis of nanoformulations and by the Ministry of Education and Science of Russian Federation (Contract no. 14.N08.11.0079) in the part of investigation of nanoformulations *in vivo*.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

References:
1. Kabanov A., Bronich T., Batrakova E., Gendelman H. Compositions for protein delivery and methods of use thereof // Pat. WO/2008/141155 A1.

УДК 611.018.

К ВОПРОСУ О ВОЗМОЖНЫХ ПЕРСПЕКТИВАХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КОМПЕЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ГОНОАРТРОЗА

Хрупа Д.А. [1,3], **Мальчевский В.А.** [1,2,3].

[1] *ФГБУН Тюменский Научный Центр СО РАН, г. Тюмень, d.a.khrupa@mail.ru*
[2] *ФГБОУ ВО «Тюменский государственный университет», г. Тюмень, d.a.khrupa@mail.ru*
[3] *ФГБОУ ВО «Тюменский ГМУ», г. Тюмень, d.a.khrupa@mail.ru*

Изучено влияние применения стволовых клеток на течение посттравматического гонартоза. Доказано, что их использование в эксперименте действенно останавливает нарастание патологических морфологических изменений в тканях коленного сустава, улучшая результаты лечения.

Ключевые слова: стволовые клетки, гонартроз, остеоартроз.

Введение. В последние годы, несмотря на внедрение в медицинскую практику нового оборудования, технологий и лекарственных препаратов отмечаются не удовлетворительные результаты лечения больных с посттравматическими заболеваниями суставов [1, 2]. Перспективным направлением для фармакологической стимуляции регенерации повреждённого хряща, на наш взгляд, может стать использование цитотерапии.

Цель исследования: оценить в эксперименте влияние цитотерапии на посттравматическую репарацию гиалинового хряща коленного сустава.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили наблюдения за 90 лабораторными кроликами Калифорнийской породы женского пола с посттравматическим гонартрозом I рентгенологической стадии с преимущественной III – IV степенью хондромаляции (ХМ) суставного хряща, разделёнными на три равные группы по 30 особей в каждой. В I группе после моделирования гонартроза лечение не проводилось. Во II экспериментальной группе лечебные мероприятия состояли из артроскопии и медикаментозного лечения, а в III - вместо медикаментозной терапии применялась регенерационная цитотерапия. В качестве факторов роста в регенерационной цитотерапии использовались фетальные стволовые клетки. Они вводились внутрисуставно пункционно на 3 сутки после завершения артроскопии однократно в количестве 500000 единиц в качестве среды для введения использовалось 0,5 мл изотонического 0,9% раствора $NaCl_2$. Артроскопия у кроликов осуществлялось в начале исследования, и через 3, и 6 месяцев после.

Результаты исследования и их обсуждение. В динамике, у животных I группы, после моделирования гонартроза преимущественная степень ХМ суставного хряща оставалась стабильной весь период исследования. Во II группе отмечалось не значительное улучшение преимущественной степени ХМ суставного хряща за счёт частичного заполнения дефекта фиброзной тканью. У животных III группы выявлено значительное улучшение преимущественной степени ХМ суставного хряща и существенное регрессирование артроскопической картины патологического процесса хрящевой ткани через 3 и 6 месяцев от начала лечения. При применении цитотерапии в составе лечебных мероприятий у кроликов не было выявлено никаких нежелательных побочных эффектов.

Вывод: Применение в эксперименте цитотерапии в составе комплексного лечения эффективно стимулирует посттравматическую репарацию гиалинового хряща позволяя не только улучшить результаты лечебных мероприятий, но и остановить нарастание патологических морфологических изменений в тканях коленного сустава. что открывает широкие перспективы для использования клеточных технологий в реабилитации больных с посттравматическим гонартрозом.

Список литературы
1. Мальчевский В. А., Евенко А. Ю. Симптоматические препараты замедленного действия в лечении посттравматических остеоартрозов коленных суставов // Фундаментальные исследования. - 2011. – № 7. – С.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

253-255.
2. Методы диагностики посттравматического гонартроза / В.А. Мальчевский [и др.]. - Шадринск: Издательство ОГУП «Шадринский Дом Печати», 2011. 236 с.

UDC 611.018.

REVISITING THE POSSIBILITIES FOR THE FUTURE THE USE OF STEM CELLS IN THE HOLIATRY OF POST-TRAUMATIC GONARTHROSIS

Khrupa D. A. [1,3], Malchevskiy V. A. [1,2,3]

[1] Tyumen Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Tyumen, d.a.khrupa@mail.ru
[2] Tyumen State University, Tyumen, d.a.khrupa@mail.ru
[3] Tyumen State Medical University, Tyumen, d.a.khrupa@mail.ru

Influence of use of stem cells on a current of a post-traumatic gonarthrosis is studied. It is proved that their use in the experiment effectively suppress the growth of pathological morphological changes in tissues of a knee joint, improving results of treatment.

Key words: stem cells, gonarthrosis, osteoarthrosis.

Introduction. In recent years, in spite of the introduction into medical practice of new equipment, technologies and medicines are not observed satisfactory results of treatment of patients with post-traumatic joint diseases [1, 2]. Cytotherapy use can become the perspective direction for pharmacological stimulation of regeneration of the injured cartilage, in our opinion.

Research objective: to estimate influence of cytotherapy on post-traumatic reparation of a hyaline cartilage of a knee joint in an experiment.

Material and methods: Material for a research were observations of 90 laboratory rabbits of female Californian breed with gonarthrosis of the I radiological stage with predominantly of III-IV of chondromalacia (HM) of an articulate cartilage, divided into three equal groups on 30 individuals in everyone. In the I group after modeling of a gonarthrosis treatment wasn't carried out. In the II experimental group curative measure consisted of an arthroscopy and drug therapy, and in III - instead of medicamentous therapy regeneration cytotherapy was applied. In the capacity of the growth factors in regeneration cytotherapy fetal stem cells were used. They were injected intra-articularly puncture on day 3 after end of an arthroscopy once in number of 500000 units as environment for introduction used 0,5 ml of isotonic 0,9% of NaCl2 solution. An arthroscopy at rabbits was carried out at the beginning of the research, and in 3, and 6 months later.

Results of a research and their discussion: In dynamics, at animal the I groups, after modeling of a gonarthrosis with predominantly of III-IV of HM of an articular cartilage remained stable the entire period of a research. In the II group minor improvement of primary degree of HM of an articulate cartilage due to partial filling of defect by fibrous tissue was noted. At animals of the III group significant improvement of primary degree of HM of an articular cartilage and an essential retrogressing of an arthroscopic picture of pathological process of cartilaginous tissue in 3 and 6 months from an initiation of treatment is revealed. At application of cytotherapy as a part of medical actions at rabbits unwanted side effect hasn't been revealed.

Conclusion: Application of cytotherapy as a part of complex treatment effectively stimulates a post-traumatic reparation of a hyaline cartilage in experiment allows not only to improve results of medical actions, but also to stop increase of pathological morphological changes in tissues of a knee joint, what opens broad prospects for use of cellular technologies in rehabilitation of patients with a post-traumatic gonarthrosis.

Reference:

1. Malchevsky V. A., Evenko A. Yu. Symptomatic medication of the deferred action in treatment of post-traumatic osteoarthrosis of the knee. //Basic researches. - 2011. – No. 7. – Page 253-255.
2. Methods of diagnostics of a post-traumatic gonarthrosis. / VA. Malchevsky [etc.]. - Shadrinsk: Publishing house OGUP "Shadrinsk Publishing House", 2011. 236 pages.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 547.9;577.15

ПРИМЕНЕНИЕ ПЭГ-ХИТОЗАНА И ХИТОЗАНА ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ ERWINIA CAROTOVORA

[1] Суховерков К.В., [1] Малахова М.А.,. [1] Царенко Е. А., [2] Александрова С.С., [2]Покровская М.В., [2] Соколов Н.Н., [1] Кудряшова Е.В.

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
[2]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия
Москва, Россия, 119991, Ленинские горы 1 стр. 3
e-mail: suhowerkov@yandex.ru

Разработан новый подход к улучшению биокаталитических свойств L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, основанный на модификации фермента сополимерами ПЭГ и хитозана различного состава (хитоПЭГилирование). Показано, что хитоПЭГилирование увеличивает каталитическую и цитотоксическую активность L-аспарагиназы.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, хитозан, ПЭГ, конъюгаты, каталитическая активность, противоопухолевая активность.

L-Аспарагиназа, относится к классу амидогидролаз и катализирует реакцию гидролиза аспарагина до аспарагиновой кислоты, что делает возможным её применение в терапии различных видов миелом и острого лимфобластного лейкоза. Однако медицинское использование фермента ограничено его неустойчивостью в кровотоке и повышенной имунногенностью, нередко ведущей к анафилактическому шоку. Поэтому актуальна задача разработки новых высокоэффективных L-аспарагиназных препаратов пролонгированного действия.

Для решения данной задачи нами предложен новый подход к регуляции каталитических свойств ферментов, используемых в медицине, который основан на образовании ковалентных конъюгатов фермента с разветвленными сополимерами полиэтиленгликоля (ПЭГ) и хитозана. Эффективность метода исследовали на примере нового рекомбинантного препарата L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* (EwA). Данный препарат является иммунологически отличным от используемых в медицине препаратов L-аспарагиназы *E. coli*, что определяет перспективы его использования в качестве альтернативы при развитии гиперчувствительности. Оптимизация молекулярной архитектуры и состава конъюгатов приводит к увеличению в 4–6 раз каталитической эффективности фермента в отношении L-аспарагина при физиологических условиях. В опытах *in vitro* показано, что конъюгаты EwA-ПЭГ-хитозан проявляют более высокую противоопухолевую активность (на 20-40%) по сравнению с нативным ферментом в отношении клеток хронического миелоидного лейкоза K562 и клеток аденокарциномы молочной железы MCF7.

Для дальнейшей оптимизации условий получения конъюгата было исследовано влияние используемого при синтезе соотношения полимера и фермента на активность конъюгата. При этом было установлено, что наибольшая удельная активность достигается при мольном соотношении хитозан-фермент 3-5:1. Для контроля степени очистки конъюгата был разработан метод определения состава препаратов конъюгатов L-аспарагиназы и хитозана с использованием ионообменной и гель-проникающей хроматографии. С использованием данной методики предложен препаративный метод очистки конъюгатов на основе метода ультрафильтрации.

Полученные результаты открывают перспективы создания L-аспарагиназных препаратов с улучшенными фармакокинетическими свойствами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-04-00325.

UDC 547.9;577.15

THE UTILISATION OF PEG-CHITOSAN AND CHITOSAN FOR REGULATION OF BIOCATALYTIC PROPERTIES OF THE RECOMBINANT L-ASPARAGINASE FROM ERWINIA CAROTOVORA

[1]Sukhoverkov K.V., [1]Malakhova M.A., [1]Tsarenko E.A., [2]Alekxandrova S.S., [2]Pokrovskaya M.V., [2]Sokolov N. N., [1]Kudryashova E. V.

[1]Lomonosov MSU, Chemical Department: Moscow, Russia,
[2]Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry: Moscow, Russia
Moscow, Russia, Leninskye gory, 1 building 3, 119991
e-mail: suhowerkov@yandex.ru

A new approach for improvement of biocatalytic properties of Erwinia carotovora L-asparaginase is developed. The approach is based on modification of the enzyme by copolymers of polyethylene glycol (PEG) and chitosan (chitoPEGylation). It was demonstrated that chitoPEGylation improved catalytic and cytotoxic activity of the enzyme.

Key words: L-asparaginase, chitosan, PEG, conjuates, catalytic activity, antitumor activity

L-asparaginase belongs to the class of threonine-amidohydrolase and catalyzes the hydrolysis of asparagine to aspartic acid accompanied by the release of ammonia. This determines the application of L-asparaginase in the therapy of acute lymphoblast leukemia (ALL), and different lymphomas. However, the therapeutic use of bacterial L-asparaginases is complicated by their instability in the bloodstream and enhanced immunogenicity, which result in side effects ranging from allergic reactions to anaphylactic shock. Consequently, it is of great importance to develop new highly effective asparaginase preparations with prolonged action.

To solve this problem, we propose a new approach to the regulation of enzyme catalytic properties that is based on the formation of covalent enzyme conjugates with branched chitosan copolymers with polyethylene glycol (PEG) (chitoPEGylation). The efficiency of this approach was studied using L-asparaginase from Erwinia carotovora (EwA) as a model. This enzyme is immunologically different from L-asparaginase from E. coli used in medical practice. This determines the prospects of its use as an alternative in case of the development of hypersensitivity to the primary preparation.

The optimization of composition and structure of the conjugates lead to 4 – 6 fold improvement of the enzyme's catalytic efficiency (kcat/Km) at physiological conditions. It was demonstrated by experiments in vitro that antitumor activity of the conjugates against cells of human myeloid leukemia (K562) and human breast adenocarcinoma cells (MCF7) was higher by 20 – 40% in comparison with the native EwA.

For further optimization of the approach the influence of enzyme-polymer ratio on activity of the conjugates was investigated. It was shown that the optimal molar ratio is 3 – 5:1 (chitosan:enzyme). To control purity of the modified enzyme an assay based on ion-exchange and size-exclusion chromatography was developed. The assay was used to design a preparative method for purification of the conjugates by ultrafiltration.

Therefore, ChitoPEGylation can be suggested as a perspective approach for the development of improved forms of L-asparaginase medicines with improved biopharmaceutical properties.

This work was supported by RFBR grant 14-04-00325

.....

УДК 577.122

СКРИНИНГ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОИСКА ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕИНАЗ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Гордонова И.К., Никитина З.К.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия
117216, Москва, ул. Грина, 7
igordonova777@yandex.ru

Изучена протеолитическая активность 47 штаммов дейтеромицетов из коллекции ФГБУ ВИЛАР, позволя-

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

ющая в дальнейшем использовать наиболее активные продуценты в медицине, ветеринарии, косметологии, а также биотехнологии и экологии.

Ключевые слова: микромицеты, коллагенолитическая активность, кератинолитическая активность, протеолитическая активность.

Цель работы – изучение и сохранение биоколлекции микромицетов ФГБНУ ВИЛАР для проведения приоритетных фундаментальных и прикладных исследований, включающих скрининг микромицетов для выявления продуцентов протеиназ, перспективных для использования в медицине. Объектом исследования являлись 47 штаммов 40 видов микромицетов из биоколлекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЛАР. В работе использовали морфологические, культуральные и биохимические методы исследования микроорганизмов. В результате исследования были впервые разработаны и утверждены паспорта 18 штаммов дейтеромицетов, обладающих протеолитической активностью. Проведена сравнительная оценка протеолитической, коллагенолитической, кератинолитической активностей микромицетов, позволяющая использовать различные исследованные штаммы в медицине, ветеринарии, косметологии, а также биотехнологии и экологии. Значимость проводимых исследований состоит в разработке инновационных технологий получения протеиназ на основе отечественных микроорганизмов – продуцентов.

UDC 577.122

SCREENING OF MICROMYCETES FOR PROTEASES PRODUCERS WHICH ARE PROMISING FOR USE IN MEDICINE SEARCH

Gordonova I.K., Nikitina Z.K.

Federal state scientific institution all-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, Moscow, Russia
117216, Moscow, Green street, 7
igordonova777@yandex.ru

Proteolytic activity of 47 strains of deuteromycetes from the collection of Federal VILAR was studied, which will allow using the most active producers in the medicine, veterinary medicine, cosmetology, biotechnology and ecology in future.

Key words: micromycetes, collagenolytic activity, keratinolytic activity, proteolytic activity.

The aim of the work is studying and preservation FGBNU VILAR micromycetes biocollection for the implementation of priority fundamental and applied research, including micromycetes screening to identify producers of proteases are promising for use in medicine. The objects of the study were the 47 strains of 40 species of micromycetes from microorganisms FGBNU VILAR biocollection. Morphological, cultural and biochemical methods of microorganism's investigation were used. 18 deuteromycetes strains possessing proteolytic activity passports were developed and approved for the first time. Comparative evaluation of proteolytic, collagenolytic, keratinolytic activity of micromycetes, allowing the use of different investigated strains in medicine, veterinary medicine, cosmetology and biotechnology, and ecology was conducted. Significance of the research is to develop innovative technologies for proteases production on the basis of national microorganisms – producers.

УДК 579.61

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, АНТИБИОТИКОВ И СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ И ДИСПЕРСИЮ БИОПЛЕНОК МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ *METHYLOPHILUS QUAYLEI*

А.М.Х.А. Мохамед, Д.Н. Амзаева, А.Б. Пшеничникова, В.И. Швец

Московский технологический университет, Москва, Россия
119454, г. Москва, Проспект Вернадского, д. 78
e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

Предложена модельная система для тестирования потенциальных ингибиторов образования биопленок, состоящая из двух изогенных штаммов грамотрицательной облигатной метилотрофной бактерии Methylophilus quaylei, отличающихся резистентностью к стрептомицину.

Ключевые слова: биопленки, поверхностно-активные вещества, антибиотики, соли палладия и серебра, метилотрофные бактерии.

Биопленочные, то есть растущие на поверхности твердых субстратов, популяции бактерий широко распространены в природе, как в водных, так и воздушных средах. Способность выживать в стрессовых условиях в составе биопленок является причиной резистентности патогенных бактерий к антибиотикотерапии и развития хронических инфекций, поэтому исследование закономерностей и поиск ингибиторов биопленкообразования являются, сегодня, важнейшей задачей медицинской микробиологии и фармацевтики. Для выявления у исследуемого вещества ингибирующего действия на процесс образования биопленки или способности разрушить уже образовавшуюся биопленку традиционно используют потенциально опасные госпитальные штаммы патогенных бактерий, таких как Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa и других. Ограниченный доступ к работе с такими штаммами резко снижает масштаб поиска активных веществ, поэтому целесообразно проводить предварительный скрининг на безопасных модельных системах.

Целью настоящей работы явилась разработка модельной системы для тестирования ингибиторов биопленок, состоящей из двух изогенных штаммов грамотрицательной облигатной метилотрофной бактерии Methylophilus quaylei, отличающихся резистентностью к стрептомицину [1,2]. Метилотрофные бактерии рода Methylophilus – типичные представители биоценозов бактериальных биопленок на поверхности листьев растений, органов и тканей человека (кожи, зубов, ногтей). Они характеризуются отсутствием патогенности, облигатной метилотрофией, т.е. метаболически не воздействуют на тестируемое вещество. Выбранные нами штаммы помимо устойчивости к стрептомицину отличаются зарядом и гидрофобностью клеточной поверхности, содержанием липидов, текучестью клеточных мембран, продукцией экзополисахарида.

Бактериальные биопленки получали на поверхности стерильных пластинок из тефлона, полипропилена и стекла, помещенных в качалочные колбы, полунепрерывном способом (со сменой питательной среды). Тестируемые соединения добавляли либо одновременно с инокулятом, либо к уже сформированным биопленкам. Интенсивность биопленкообразования оценивали путем окрашивания биопленки кристаллическим фиолетовым и определения в ней титра жизнеспособных бактерий. Параллельно определяли титры планктонной культуры бактерий. Были протестированы биоцидные препараты класса четвертичных аммонийных оснований – мирамистин, цетилтриметиламмония бромид, цетилпиридиния хлорид, жирные кислоты – стеариновая, олеиновая, додецилсульфат натрия, стеариламин, антибиотики, соли тяжелых металлов - тетрахлоропалладат натрия, нитрат серебра. Для антибиотиков и солей тяжелых металлов наблюдали многократное превышение выживаемости обоих штаммов в составе биопленки по сравнению с планктонной культурой, причем с увеличением концентрации токсических веществ это отношение увеличивалось. Влияние поверхностно-активных веществ на рост бактерий в биопленках или в планктонной культуре зависело от гидрофобности материала и штамма бактерии. В результате было обнаружено ингибирующее действие на рост биопленки – олеата натрия и мирамистина на полипропилене, мирамистина и стеариламина на тефлоне, стеариламина на стекле.

Литература:

1. *Doronina N., Ivanova E., Trotsenko Y., Pshenichnikova A., Kalinina E., Shvets V.* ***Methylophilus quaylei*** *sp. nov., a new aerobic obligately methylotrophic bacterium. // Sistem. Appl. Microbiol. 2005. Vol. 28. P. 303-309.*
2. *Пшеничникова А.Б., Гаврилова Е.С., Швец В.И. Влияние физико-химических свойств клеточной поверхности грамотрицательных бактерий на резистентность к стрептомицину // Вестник МИТХТ. — 2011. — Т. VI. — № 2. — С. 43-50.*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 579.61

INFLUENCE OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES AND HEAVY METALS ON THE FORMATION AND DISPERSION OF BIOFILMS METHYLOTROPHIC BACTERIUM *METHYLOPHILUS QUAYLEI*

A. M. H. A. Mohamed, D.N. Amzaeva, A.B. Pshenichnikova, V.I. Shvets

Moscow Technological University, Moscow, Russia
119454, г. Moscow, Vernadsky avenue, 78
e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

The proposed model system to test potential inhibitors of biofilm, consisting of two isogenic strains of gram-negative obligate methylotrophic bacterium Methylophilus quaylei, characterized by resistance to streptomycin.

Key words: biofilms, surface-active substances, antibiotics, salts of palladium and silver, methylotrophic bacteria.

Biofilm, that is growing on the surface of solid substrates, populations of bacteria are widely distributed in nature, both in aqueous and air environments. The ability to survive under stressful conditions in the composition of biofilms is a cause of resistance of pathogenic bacteria to antibiotic therapy and development of chronic infections, so the study of the laws and the search of inhibitors biofilm are, today, the most important task of medical Microbiology and pharmaceuticals. To determine if a test substance inhibitory action on the formation of biofilm or the ability to destroy a biofilm already formed conventionally used potentially dangerous hospital strains of pathogenic bacteria such as Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, and others. Limited access to work with such strains dramatically reduces the active substances search scope, so it is advisable to conduct a preliminary screening of safe model systems.

The aim of this work was to develop a model system for testing inhibitors of biofilms, consisting of two isogenic strains of gram-negative obligate methylotrophic bacterium Methylophilus quaylei, characterized by resistance to streptomycin [1,2]. Methylotrophic bacteria of the genus Methylophilus is a typical representative communities of bacterial biofilms on the leaf surface of plants, organs and tissues (skin, teeth, nails). They are characterized by the absence of pathogenicity, obligate methylotrophy, i.e. metabolic not affect the test substance. We selected strains in addition to resistance to streptomycin differ in charge and hydrophobicity of cell surface, lipid content, fluidity of cell membranes, production of exopolysaccharide.

Bacterial biofilms were obtained on the surface of sterile plates of teflon, polypropylene and glass, placed in the flask for cultivation by semi-continuous method (with the change of the nutrient medium). The tested compounds were added either simultaneously with the inoculum or to an already formed biofilm. The intensity of biofilm formation was assessed by staining the biofilm crystal violet and determination of the titer of viable bacteria. In parallel, we determined the titers of planktonic bacteria cultures. Was tested biocides of the class of quaternary ammonium bases – synthesis, cetyltrimethylammonium bromide, cetylpyridinium chloride, fatty acids – stearic, oleic, sodium dodecyl sulfate, stearylamine, antibiotics, salts of heavy metals - tetrachloropalladate of sodium, nitrate of silver. For antibiotics and heavy metal salts were observed multiple excess survival of both strains in the composition of the biofilm compared with planktonic culture, and with increasing concentration of toxic substances this ratio is increased. The influence of surfactants on the growth of bacteria in biofilm or in planktonic culture was dependent on the hydrophobicity of the material and the strain of bacteria. In the result, it was found inhibitory effect on the growth of biofilm – sodium oleate and miramistin on polypropylene, miramistin and stearylamine on teflon, stearylamine on the glass.

References:

1. *Doronina N., Ivanova E., Trotsenko Y., Pshenichnikova A., Kalinina E., Shvets V. Methylophilus quaylei sp. nov., a new aerobic obligately methylotrophic bacterium. // Sistem. Appl. Microbiol. 2005. Vol. 28. P. 303-309.*
2. *Пшеничникова А.Б., Гаврилова Е.С., Швец В.И. Влияние физико-химических свойств клеточной поверхности грамотрицательных бактерий на резистентность к стрептомицину // Вестник МИТХТ. — 2011. — Т. VI. — № 2. — С. 43-50.*

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 637.5

РАЗРАБОТКА БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ФОРМ КОЛЛАГЕНОВЫХ СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Антипова Л.В., Сторублевцев С.А.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий,
г. Воронеж, Россия
394036, г. Воронеж, пр-т Революции,19
e-mail: c11111983@yandex.ru

Получены биодеградируемые материалы на основе коллагенов животных и гидробионтов, проведены их доклинические испытания. Получены результаты, предполагающие возможность использования разработанных материалов в качестве ранозаживляющих.

Ключевые слова: коллагены, ранозаживление, биодеградируемые материалы, сорбция.

Лечение больных с различными видами ран, профилактика раневой инфекции до настоящего времени продолжают оставаться актуальными проблемами хирургии, являясь наиболее частыми причинами первичной обращаемости хирургических больных. Послеоперационная раневая инфекция достигает 9% при «чистых» операциях, 22,4% - при контаминированных вмешательствах

В решениях многочисленных форумов и съездов хирургов подчеркивается важность поиска новых средств и методов лечения ран, предупреждения развития и ликвидации раневой инфекции, стимуляции процессов регенерации, реализации новых подходов в лечении ран с учетом современного уровня развития смежных наук.

В результате выполненного комплекса исследований разработаны формы коллагена: гели, растворы с различной массовой долей активного вещества, пористые материалы, порошки, пленки, в том числе иммобилизованные.

В настоящее время проводятся совместные исследования с сотрудниками ФБГОУ ВО ВГМА им. Бурденко по разработке универсальной технологии получения коллагеновых субстанций из альтернативных источников, имеющих низкую себестоимость, и изучение применения различных методов введения и форм коллагеновых субстанций в комплексном лечении асептических и гнойных ран мягких тканей.

Результаты проведенных доклинических испытаний показали эффективность разработок в опытах на лабораторных животных, в частности процесс тканевого ранозаживления укорялся в 1,5-2 раза по сравнению с контрольной группой. Получены убедительные данные, свидетельствующие об ускорении репаративных процессов в мягких тканях под воздействием материалов на основе коллагенов как животного происхождения, так и коллагеновых материалов, выделенных из гидробионтов.

Особенно выраженное воздействие было отмечено в первой фазе раневого процесса, что проявлялось в стимуляции ангиогенеза, коллагеногенеза, активации метаболических процессов, сопровождающихся повышением уровня реакций при выявлении РНК. Проведенные экспериментальные исследования не выявили токсического и аллергического действий коллагеновых материалов как при анализе клинических данных, так и при изучении результатов гистологического и гистохимического исследований. Дополнительно установлена высокая активность субстанций к сорбции ионов металлов, антибиотиков, образованию комплексов с полисахаридами. Исследования были выполнены в рамках Прикладных научных исследований и экспериментальных разработок (НИР №3017) базовой части государственного задания №2014/22.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

UDC 637.5

THE DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE FORMS OF COLLAGEN SUBSTANCES FOR MEDICINE

Antipova L. V., Storublevtsev S.A.

Voronezh State University of engineering technologies,
Voronezh, Russia
394036, Voronezh, Revolution Ave, 19
e-mail: c11111983@yandex.ru

The biodegraded materials on the basis of collagens of animals and hydrobionts are received, their preclinical tests are carried out. The results assuming a possibility of use of the developed materials as wound healing are received.

Key words: collagens, healing of wounds, the biodegraded materials, a sorption.

Treatment of patients with different types of wounds, prophylaxis of a wound fever continue to remain urgent problems of surgery so far, being the most frequent reasons of primary appealability of surgical patients. The postoperative wound fever reaches 9% at "pure" operations, 22,4% - at the interventions.

In decisions of numerous forums and congresses of surgeons importance of search of new agents and methods of treatment of wounds, preventions of development and elimination of a wound fever, stimulation of processes of neogenesis, realization of new approaches in treatment of wounds taking into account the modern level of development of interdisciplinary sciences is emphasized.

As a result of the executed complex of researches collagen forms are developed: gels, solutions with various mass fraction of active agent, the porous materials, powders, Membranulas including immobilized.

Now joint researches with employees of the Voronezh state medical University on development of universal technology of receiving collagenic substances from the alternative sources having low cost, and studying of use of various methods of introduction and forms of collagenic substances in complex treatment of aseptic and purulent wounds of soft tissues are conducted.

Results of the carried-out preclinical tests showed efficiency of developments in experiences on laboratory animals, in particular process of a fabric healing of wounds was reproached by 1,5-2 times in comparison with control group. The convincing data confirming acceleration of reparative processes in soft tissues under the influence of materials on the basis of collagens of both animal origin, and the collagenic materials emitted from hydrobionts are obtained.

Especially expressed influence was noted in the first phase of a wound process that was shown in stimulation of an angiogenesis, activation of the metabolic processes which are followed by rising of level of reactions at identification of RNA. The conducted pilot studies didn't tap toxic and allergic effects of collagenic materials both in the analysis of clinical data, and when studying results of histological and histochemical researches. High activity of substances to a sorption of ions of metals, antibiotics, formation of complexes with polysaccharides is in addition established. Researches were executed within Applied scientific research and experimental developments (No. 3017 NIR) of a basic unit of the state task No. 2014/22.

УДК 578

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ДИМЕРНЫХ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ В КЛЕТКАХ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА IN VITRO

Климова Р.Р.[1], Момотюк Е.А.[1], Демидова Н.Д.[1], Коваль В.С.[2], Иванов А.А.[2], Жузе А.Л.[2], Кущ А.А.[1].

[1]ФГБУ «Федеральный научный исследовательский центр микробиологии и эпидемиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства Здравоохранения Российской Федерации подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва, Россия
123098, г. Москва, ул. Гамалеи д. 16.
E-mail: regi.k@mail.ru
[2]ФГБУ науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Изучена противовирусная активность 6 новых АТ-специфичных симметричных димерных бисбензимидазолов в отношении инфекции, вызванной вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ1) in vitro. Показано, что 2 соединения подавляют ВПГ1-инфекцию в микробицидной и терапевтической схемах воздействия *in vitro*.

Ключевые слова: димерные бисбензимидазолы; вирус простого герпеса; герпесвирусная инфекция *in vitro*.

Инфекции, вызванные вирусом простого герпеса (ВПГ), являются глобальной проблемой здравоохранения в мире. По данным ВОЗ частота распространения клинических форм ВПГ-инфекции среди населения в возрасте до 49 лет составила 67%, в том числе рецидивирующего генитального герпеса – 11,8% [1, 2]. В терапии герпесвирусных инфекций применяется ряд патентованных препаратов – ацикловир и его производные. Основными недостатками этих препаратов являются токсичность, ограниченная биодоступность и развитие лекарственной устойчивости. В связи с этим активно проводится разработка инновационных противовирусных препаратов, лишенных побочных токсических эффектов при сохранении высокой противовирусной эффективности.

Цель работы состояла в изучении противовирусной активности вновь синтезированных димерных бисбензимидазолов серии DBA(n) в отношении ВПГ-инфекции *in vitro*. Изучены 6 новых хорошо растворимых в воде флуоресцентных АТ-специфичных димерных бисбензимидазолов DBA(n), у которых бисбензимидазольные фрагменты молекулы связаны олигометиленовым линкером с разным числом метиленовых групп в линкере (n=1,3,5,7,9,11). 50%-ную цитотоксическую дозу ($ЦД_{50}$) оценивали через 72 ч после внесения соединений в культуру клеток Vero. Противовирусную активность соединений исследовали в четырех схемах воздействия: при внесении за 24 ч до заражения ВПГ1 (профилактическая), за 1 ч – микробицидная (экстренная профилактика), через 1 ч после заражения (лечебная) и совместно ВПГ1+соединения (вирулицидная схема). Во всех схемах через 2 сут определяли 50% ингибирующую дозу ($ИД_{50}$) и рассчитывали значение химиотерапевтического индекса (ХТИ) как отношение $ЦД_{50}$ к $ИД_{50}$. Установлено, что наименее токсичным было DBA(7) ($ЦД_{50}$>1000 мкг/мл), наиболее токсичным – DBA(5), у остальных соединений $ЦД_{50}$ составляла от 288 мкг/мл до 607 мкг/мл. Анализ противовирусных свойств исследуемых соединений показал, что соединение DBA(7) проявило противовирусную активность в отношении ВПГ-инфекции во всех изученных схемах с ХТИ>100. Соединение DBA(1) обладало выраженными микробицидными свойствами (ХТИ=318). Согласно существующим представлениям, ХТИ=/>100 позволяет рекомендовать препарат к проведению дальнейших доклинических испытаний. Таким образом, создана новая серия флуоресцентных ДНК-специфичных бидентатных лигандов DBA(n), хорошо растворимых в воде, способных узнавать нуклеотидные последовательности, содержащие блоки из двух АТ-пар, находящихся на разных расстояниях друг от друга. Установлено, что соединение DBA(7) обладает не только лечебными и профилактическими свойствами *in vitro*, но также нейтрализует инфекционную активность вируса (вирулицидная схема) и может рассматриваться как микробицид – кандидатный препарат для экстренной профилактики. Создание микробицидов – до-контактных средств экстренной профилактики для интравагинального и/или интраректального использования признано ВОЗ как приоритетное направление в борьбе с ВИЧ-инфекцией и другими инфекциями, передающимися половым путем. Доказано, что генитальный герпес является одним из важнейших факторов риска приобретения ВИЧ-1 [3]. Можно предположить, что разработка микробицидов на основе DBA(1) и DBA(7) сможет предотвращать заражение ВПГ 1 и 2 типа, развитие генитального герпеса и будет способствовать также снижению распространения ВИЧ-инфекции.

Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012 // PLoS One. 2015. Vol.10. №10. e0140765.

Looker K.J., Magaret A.S., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012 // PLoS One 2015. Vol.10. №1. e114989.

Moore M.D., Bunka D.H., Forzan M., Spear P.G., Stockley P.G., McGowan I. et al. Generation of neutralizing aptamers against herpes simplex virus type 2: potential components of multivalent microbicides // J Gen Virol. 2011. Vol.92. №7. P. 1493-1499.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

UDC 578

ANTIVIRAL ACTIVITY OF DIMERIC BISBENZIMIDAZOLOV IN HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTED CELLS IN VITRO

R.R. Klimova[1], E.D. Momotyuk[1], N.A. Demidova[1], V.S. Koval[2], A.A. Ivanov[2], A.L. Zhuze[2], A.A. Kushch[1].

[1]"N.F. Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology", Ivanovsky Institute of Virology, The Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Gamaleya str. 16, Russia;
[2]"Engelhardt Institute of Molecular Biology" Russian Academy of Sciences; 119991, Moscow, Vavilova str 32, Russia;
R.R. Klimova: regi.k@mail.ru, 8(499)1903049, 123098, Moscow Gamaleya str 16.

Key words: Dimeric Bisbenzimidazoles containing N-dimethylaminopropylcarboxamide group; Herpes Simplex Virus; antiviral activity; Herpes Virus Infection in vitro.

Studied the antiviral activity of 6 new AT-specific symmetrical dimeric bisbenzimidazolov against infection caused by herpes simplex virus type 1 (HSV1) in vitro. It is shown that the two compounds inhibit HSV1-infection in microbicidal and therapeutic schemes in vitro.

Infections caused by herpes simplex virus (HSV) are a global health care problem. WHO has reported a 67% spread of HSV infection, including recurrent genital herpes (11.8%), in adult (under 49 years) human population [1, 2]. Patented drugs, for example acyclovir and its derivatives, used in therapy of HSV infections have the following disadvantages: toxicity, low bioavailability and development of antiviral resistance. This prompts the search for innovative drugs with low toxicity and high antiviral activity.

Our objective was to assess in vitro anti-HSV activity of 6 new synthetic highly water-soluble AT-specific fluorescence symmetric DBA(n) bisbenzimidazoles in which bisbenzimidazole fragments are bound to an oligomethylene liner with varied number of methylene groups in the linker (n = 1, 3, 5, 7, 9, 11). 50% cytotoxic dose (CC_{50}) was determined after a 72-h incubation of these compounds with cultured Vero cells. Four schemes were used: preventive (the agents were added 24 h before infection), extra-preventive (microbicide, 1 h before infection), therapeutic (1 h after infection) and virulicide (HSV and agent were added simultaneously). 50% -inhibiting dose (ID_{50}) was determined after a 48-h incubation in all schemes, and selectivity index (SI) was calculated as the CC_{50} / ID_{50} ratio. The lowest (CC_{50}>1000 μg/ml) and the highest toxicities were demonstrated by DBA(7) and DBA(5), respectively. CC_{50} of other compounds varied from 288 μg/ml to 607 μg/ml. DBA(7) displayed antiviral activity with SI>100 in all schemes. DBA(1) produced a pronounced microbicide effect (SI=318). According to current regulations, a compound with SI=/>100 can be recommended for preclinical studies. Thus, a new series of fluorescent DNA-specific bidentate ligands DBA(n) has been created. These agents are readily soluble in water, recognize nucleotide sequences containing blocks of two AT pairs located at different distances from each other. DBA(7) has in vitro therapeutic and preventive activities and neutralizes infectious activity of HSV (virilicide activity). This compound can be regarded as a candidate microbicide drug for urgent prevention. Development of intravaginal or inrarectal microbicides for precoital urgent prevention is among the WHO priorities in combat against HIV and other sexually transmitted diseases. Genital herpes is a risk factor strongly associated with HIV-1 [3]. It can be suggested that microbicides based on DBA(1) and DBA(7) are capable of preventing HSV1 and HSV2 infection, development of genital herpes and slow down the spread of HIV infection.

References:

1. *Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012 // PLoS One. 2015. Vol.10. №10. e0140765.*
2. *Looker K.J., Magaret A.S., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012 // PLoS One 2015. Vol.10. №1. e114989.*
3. *Moore M.D., Bunka D.H., Forzan M., Spear P.G., Stockley P.G., McGowan I. et al. Generation of neutralizing aptamers against herpes simplex virus type 2: potential components of multivalent microbicides // J Gen Virol. 2011. Vol.92. №7. P. 1493-1499.*

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 57.579.6

ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИФУНГАЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА, ПРОДУЦИРУЕМОГО ШТАММОМ BACILLUS MOJAVENSIS LHV-97

Лев И. О., Дунайцев И.А., Похиленко В.Д.

Федеральное бюджетное учреждение науки - Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора
142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск
e-mail: doggylev@mail.ru; pokhilenko@obolensk.org

Исследован штамм *B. mojavensis* Lhv-97, производящий вещества с противогрибковой активностью. Подобраны среды и режимы его культивирования для получения практически значимых количеств антифунгальных субстанций. С применением ВЭЖХ определены условия выделения и очистки активного противогрибкового вещества. Методами газовой хроматографии выявлена аминогликозидная природа данного вещества и установлено, что его молекула содержит два остатка глюкозы, а также по одному остатку аминированного циклита C_6 и легкого полиола.

Ключевые слова: антифунгальное вещество, продуцент, хроматографическая очистка, газовая хроматография, аминогликозид.

Целью работы являлся подбор условий выделения и очистки активного противогрибкового метаболита для определения его природы, свойств и дальнейшего использования.

Материалы и методы. В работе по скринингу антагонистически активных штаммов, их культивированию, извлечению метаболитов из ферментатов использовали методы общей бактериологии и биотехнологии. Хроматографическую очистку проводили на колонке С18 с применением гидрокарбоната аммония и деионизированной воды в качестве элюэнтов. Для определения чистоты, молекулярной массы и природы действующего начала антимикотика использовали методы масс-спектрометрии и газовой хроматографии. При оценке термостабильности, растворимости и гидролизуемости противогрибкового вещест–ва применяли комплекс физико-химических методов исследований.

Основные результаты исследований. На первом этапе исследований в ходе экспериментов по выбору питательной среды и условий глубинного культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97 была определенная целесообразность использования минеральной среды на основе фосфата аммония, глюкозы и проведения ферментации при температуре 37° С в течение 24-36 ч. На втором этапе искали способ выделения из ферментатов культуры активных веществ и проводили их первичное изучение. Поскольку в опытах по оценке возможности экстракции антимикотических метаболитов с использованием ацетона, четыреххлористого углерода, хлороформа, дихлорметана, этилацетата, этилового, изобутилового, изоамилового и метилового спирта выделить их из супернатанта культуральной жидкости не удавалось, был сделан вывод о гидрофильности действующих веществ. Антимикотические метаболиты проявляли устойчивость к нагреву до 100 °С и к обработке трипсином, а с помощью диализа было определено, что размер веществ, обеспечивающих их специфическую активность, составляет менее 1 кДа. При использовании модифицированной колонки С18 показана возможность разделения изучаемых метаболитов. Однако на колонке в активной фракции вещества оставалось значительное количество примесей, которые не удалялись с помощью обращенно-фазовой хроматографии высокого и низкого давления. Для этого требовалось провести его доочистку от примесей, которую удалось осуществить с помощью эксклюзионной хроматографии. На заключительном этапе работы исследовали состав и свойства активной фракции вещества с чистотой не менее 95%. С помощью методов газовой хроматографии было установлено, что антимикотическое вещество штамма *B. mojavensis* Lhv-97 является аминогликозидом, включающий два остатка глюкозы, по одному остаток аминированного циклита C_6 и легкого полиола. Основываясь на положительных результатах биотестирования выделенного антимикотика, было сделано предположение о возможности его практического использования для лечения человека и животных.

Работа выполнялись в рамках тематики НИР ФБУН ГНЦ ПМБ и запланированной темы диссертации.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

UDC 57.579.6

PRODUCTION, PURIFICATION AND PRIMARY CHARACTERIZATION OF ANTI-FUNGAL SUBSTANCE PRODUCED BY BACILLUS MOJAVENSIS STRAIN LHV-97

Lev I. O., Dunaitsev I.A, Pokhilenko V.D.

Federal Budget Science Institution – State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (FBSI SRCAMB), Rospotrebnadzor
142279 Moscow region, Serpukhov district, Obolensk
e-mail: doggylev@mail.ru ; pokhilenko@obolensk.org

B. mojavensis strain Lhv-97, which produces active anti-fungal substances, has been investigated. Culture media and regimen of its cultivation allowing the production of an anti-fungal substance in practically significant amounts have been selected. Conditions of isolation and purification of the substance have been determined by HPLC. A gas chromatography research has revealed the aminoglycoside nature of the substance, and its molecule is found to contain two glucose residues, and one residue of amidated cyclite C6 and light polyol, respectively.

Key words: anti-fungal substance, producer, chromatographic purification, gas chromatography, aminoglycoside.

The objective of the research was to select appropriate conditions to isolate and purify an active anti-fungal metabolite followed by determining its nature, properties, and potentialities of further application.

Materials and Methods. Screening of the most active antagonists, their cultivation, and isolation of enzymic metabolites were performed by methods of general bacteriology and biotechnology**.** The products were purified using column C18 and ammonium hydrocarbonate and deionized water as eluents. The degree of purity, molecular weight and the nature of the active agent of the antimycotic preparation were determined by mass-spectrometry and gas chromatography. A complex of physicochemical methods was applied to assess its thermostability, solubility and ability to hydrolyze.

Main Results. At step 1 when choosing an appropriate nutrient medium and regimen of submerged fermentation of *B. mojavensis* Lhv-97 the feasibility of using ammonium phosphate and glucose – based mineral media and culture regimen at 37° C for 24-36h was determined. Step2 aimed at searching for an appropriate method of isolation of active substances from culture fermentats followed by their initial studying. Experimental isolation of anti-mycotic metabolites from the supernatant of the culture fluid by means of acetone, carbon tetrachloride, chloroform, dichloromethane, and ethyl acetate, ethyl, isobutyl, isoamyl and methyl alcohols failed, so it was concluded that active agents were hydrophilic. The antimycotic metabolites were resistant to heating up to 100 °C, as well as to trypsin. The size of substances ensuring their specific activity was less than 1 kDa as shown by dialysis. By using a modified column C18 the possibility of separating the analyzable metabolites was tested. But in the column the active fraction of the substance still contained many impurities, which failed to be removed by reverse phase chromatography both of high and low pressure. To eliminate them extra purification was needed. It was successfully performed by size exclusion chromatography. Finally, the composition and properties of the active fraction of the substance with purity of not less than 95% were studied. It was shown by gas chromatography that the anti-mycotic substance from *B. mojavensis* strain Lhv-97 was an aminoglycoside carrying two glucose residues, and one residue of amidated cyclite C6 and light polyol, respectively.

Successful results from biotesting the antimycotic preparation suggest its practical application in treating humans and animals.

The research was carried out under the R&D schedule of the FBSI SRCAMB, and also in compliance with the planned dissertation topic.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 615.33(076.5) (075.8)

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК CHO, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО АДАЛИМУМАБ, В БИОРЕАКТОРАХ РАЗЛИЧНОГО ТИПА

Воронина Е.В.[1], Лобанова Н.В.[1], Яхин И.Р.[1], Горожанина Е.В.[1], Хаджиев Т.А.[1], Чеботарева А.В.[1], Швец В.И.[2], Серегин Ю.А.[1]

[1]ГНЦ РФ ФГУП НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, e-mail: voronina-ek@bk.ru
[2]Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва, проспект Вернадского 86

Моноклональное антитело Адалимумаб является основным представителем группы блокаторов ФНО-α для лечения ревматоидного артрита и других наиболее распространенных воспалительных артропатий. В настоящее работе проведено сравнительное исследование процессов культивирования продуцента моноклонального антитела Адалимумаб в биореакторах разного типа для сравнительного изучения динамики роста и продуктивности в целях масштабирования процесса.

Ключевые слова: биореактор, культивирование, моноклональное антитело, клетки *CHO*

Цель исследования. Сравнить эффективность культивирования клеточной линии-продуцента моноклонального антитела Адалимумаб, полученной на основе суспензионных клеток CHO, в стеклянном биореакторе с механическим перемешивающим элементом, а также биореакторах волнового и орбитального типов.

Материалы и методы. Культивирование осуществляли в среде Dynamis (Thermo Fisher Scientific, США) с периодическим добавлением комплексной подпитки Cell Boost 7a / 7b (GE Healthcare, США). Процессы осуществляли в стеклянном биоректоре с механическим перемешиванием Labfors (Infors HT, Швейцария) рабочим объемом 5 л, в биореакторе волнового типа AppliFlex (Applikon, Нидерланды) и орбитальном биореакторе Kühner SB10X (Kühner AG, Швейцария), для двух последних использовали одноразовые мешки с рабочим объемом 10 л. Засев инокулята в биореакторы осуществляли в плотности (0,40±0,10) млн клеток/мл. Процессы проводили при температуре 37°C с поддержанием pH на уровне (7,0±0,2) и концентрации растворенного кислорода на уровне (40±10) %. В ходе процесса культивирования ежедневно проводили подсчет клеточной плотности и жизнеспособности, измерение уровня глюкозы и лактата в культуральной жидкости (КЖ). При достижении клеточной плотности свыше 20x10^6 клеток/мл снижали температуру до 33°C, культивирование останавливали при снижении жизнеспособности клеток менее 70%. Концентрацию антитела в КЖ определяли методом ВЭЖХ гель-фильтрации на колонке TSKgel G2000SW (Tosoh Bioscience, Германия).

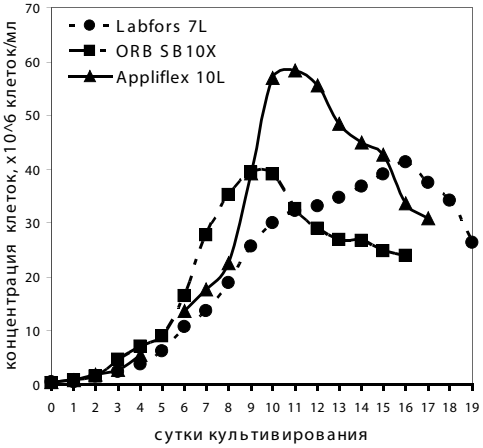


Рис.1. *Кривые роста клеточной линии, экспрессирующей моноклональное антитело Адалимумаб, полученные при культивировании в разных типах биореакторов.*

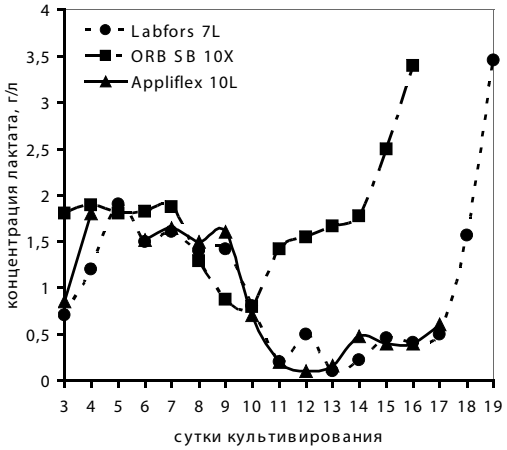


Рис.2. *Концентрация лактата на каждые сутки, при культивировании клеточной линии в разных типах биореакторов, экспрессирующей моноклональное антитело Адалимумаб.*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

Результаты. В волновом биореакторе AppliFlex продолжительность цикла культивирования составила 17 суток. Максимальное значение клеточной плотности было достигнуто на 12 день культивирования и составило 55,5 млн клеток/мл (рис. 1). При этом, выработка лактата клетками в ходе данного процесса была минимальной (рис. 2), а выход целевого продукта на последние сутки составил 1,9 г/л.

Для клеток, культивировавшихся в биореакторе с механическим перемешиванием и орбитального типов, отмечено небольшое снижение скорости клеточного роста, по сравнению с волновым биореактором. Кроме того, в данных случаях просматривалось более резкое снижение жизнеспособности клеток в зависимости от дня культивирования (рис. 1). Возможно, снижение жизнеспособности клеток может быть обусловлено их травмированием при перемешивании (механический стресс), что отразилось также на профиле накопления лактата в КЖ (рис. 2). Снижение темпа роста, жизнеспособности клеток и накопление лактата привели к уменьшению концентрации моноклонального антитела в КЖ на последние сутки. По результатам культивирования в биореакторах Labfors и Kühner SB10X максимальная клеточная плотность достигла 40 млн клеток/мл на 16 и 9 дни (рис. 1), соответственно, а продуктивность составила 1,6 и 1,4 г/л.

Вывод. Проведено изучение культуральных характеристик и продуктивности клеточной линии, экспрессирующей моноклональное антитело Адалимумаб, в разных типах биореакторов. Показано, что наиболее эффективным для данной клеточной линии является культивирование в биореакторе волнового типа.

УДК 615.33(076.5) (075.8)

PROCESS DEVELOPMENT OF CHO-CELL BASED MONOCLONAL ANTIBODY ADALIMUMAB PRODUCTION IN DIFFERENT TYPES OF BIOREACTORS

E.V. Voronina[1], N.V. Lobanova[1], I..R.. Yakhin [1], E.V. Gorozhanina[1], T.A. Khadzhiev[1], A.V. Chebatoreva[1], V..I. .Shvetc[2], Y.A. Seregin[1]

[1] Scientific Centre RF, Institute of genetics and selection of industrial microorganisms, Russia, Moscow, 1st Dorozhny proezd, 1,
e-mail: voronina@pharmapark.ru
[2] M.V. Lomonosov Moscow State Academy of fine chemical technology, Moscow, Russia

Adalimumab is the main monoclonal antibody of the group of TNF-α blockers for the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory arthropathies. The aim of the current study is to compare cultivation processes in bioreactors of various types to research dynamics of growth and productivity aimed at scale-up for the cell line producing the monoclonal antibody Adalimumab.

Key words: *bioreactor, CHO cells, cultivation, monoclonal antibody*

Aim of study. Compare the efficacy of cultivation cell line producing monoclonal antibody Adalimumab based on suspension CHO cells in stirred, wave and orbital types of bioreactors.

Materials and methods. Cultivation was carried out in Dynamis (Thermo Fisher Scientific, USA) with the periodic addition of complex feed Cell Boost 7a / 7b (GE Healthcare, USA). The processes were perfomed in a stirred glass bioreactor Labfors (Infors HT, Switzerland) with a culture volume 5 L, in the wave bioreactor AppliFlex (Applikon, Netherlands) and the orbital bioreactor Kühner SB10X (Kühner AG, Switzerland) in a 10 L disposable cellbags. Inoculation cell density was (0,40 ± 0,10) x 10^6 cells / mL. Processes were carried out at a temperature of 37 degrees C, maintaining pH at (7,0 ± 0,2) and dissolved oxygen concentration at (40 ± 10)%. During the cultivation cell density and viability was counted, glucose and lactate was measured. Shift of cultivation temperature from 37 degrees C to 33 degrees C was perfomed upon reaching cell density 20x10^6 cells / mL. The cultivation was stopped when cell viability reduction was less than 70%. The concentration of antibody was determined by HPLC gel filtration on TSKgel G2000SW column (Tosoh Bioscience, Germany).

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

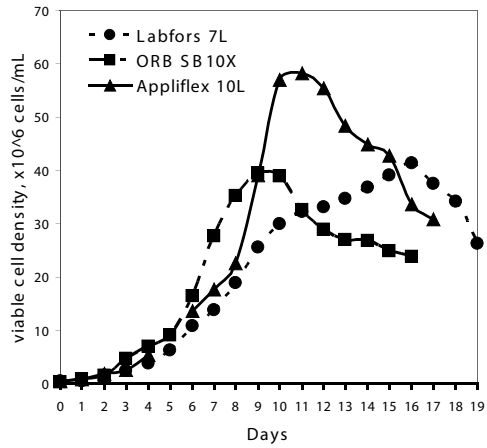


Fig.2 *Lactate production of cell line expressing the monoclonal antibody Adalimumab. Evaluations were done in different types of bioreactors*

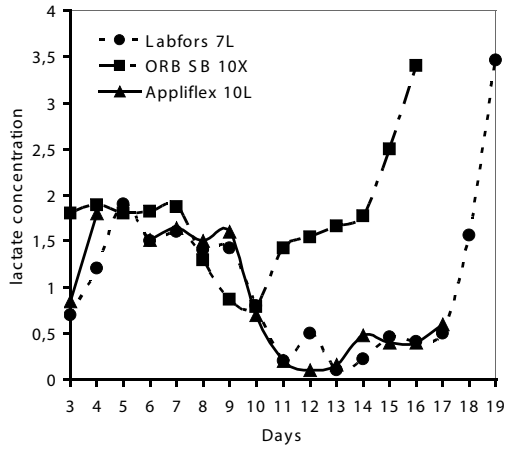


Fig.1 *Growth evaluation of cell line expressing the monoclonal antibody Adalimumab. Evaluations were done in different types of bioreactors*

Results. The process duration in wave bioreactor AppliFlex cultivation was 17 days. The maximum cell density 55.5 million cells / mL (Fig. 1) was achieved on day 12 with productivity 1.9 g / L on the last day. Moreover, accumulation of lactate by during the process was minimal (Fig. 2).

For process in stirred and orbital bioreactors was observed a slight reduction of cell growth rate compared with wave bioreactor. Thereby, in both cases it was noticed more dramatic reduction in cell viability depending of day (Fig. 1). Perhaps the reduction in cell viability was due to type of stirring (mechanical stress), which also affected the accumulation of lactate (Fig. 2). Reduced growth rate, cell viability and lactate accumulation led to a decrease in the concentration of monoclonal antibody on the last day. The maximum cell density was 40 million cells / mL during cultivation in Labfors and Kühner SB10X bioreactors. The productivity was 1.6 and 1.4 g / L respectively.

Conclusion. Thus, the investigation of cultivation efficacy for cell line producing monoclonal antibody Adalimumab based on suspension CHO cells in stirred, wave and orbital types of bioreactors was perfomed. It was shown the most effective for this cell line is wave bioreactor.

.....

УДК 578.832

ВЛИЯНИЕ ФОРМЫ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ НА ИХ СПОСОБНОСТЬ ВЫЗЫВАТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В ОРГАНИЗМЕ

Турмагамбетова А.С., Алексюк П.Г., Алексюк М.С., Зайцева И.А., Омиртаева Э.С., Богоявленский А.П., Березин В.Э.

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан
050010, Алматы, ул. Богенбай батыра, 103
e-mail: aichyck@mail.ru

Показано, что наибольшей способностью стимулировать выработку провоспалительных цитокинов и тем самым опосредованно влиять на стимуляцию клеточного иммунитета обладали иммуностимулирующие нанокомплексы, сконструированные на основе очищенных вирусных антигенов, липидов и сапонинов.

Ключевые слова: вирусные антигены, воспаление, иммунный ответ, форма надмолекулярной организации.

Биологический смысл воспаления и иммунитета — отграничение и ликвидация очага повреждения и вызвавших его патогенных факторов, а также репарация повреждённых тканей. Провоспалительные цитокины вызывают воспаление – опосредованное каскадом генных продуктов, которые, как правило, не производятся в организме у здоровых людей. IL-1 и TNF являются индукторами эндотелиальных молекул

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

адгезии, которые имеют существенное значение для адгезии лейкоцитов к эндотелиальной поверхности до миграции в ткани и являются ярко выраженными провоспалительными цитокинами [1, 2].

В наших исследованиях было проведено изучение экспрессии генов IL-1 и TNF при иммунизации экспериментальных животных различными структурными формами вирусных антигенов (HA+NA), полученных из вируса гриппа, штамм A/Алматы/8/98 (H3N2): 1) мицеллами гликопротеидных антигенов вируса гриппа; 2) виросомами – сферическими наночастицами образованными вирусными гликопротеидными антигенами и липидами; 3) иммуностимулирующими нанокомплексами – вирусоподобными наноструктурами диаметром 60 – 80 нм, сформированными гликопротеидными антигенами, липидами и сапонинами; 4) наноструктурами хитозана с адсорбированными вирусными гликопротеидами; 5) мицеллами гликопротеидных антигенов, сорбированных на гидроокиси алюминия. Для сравнения животных иммунизировали препаратами очищенных вирусных частиц. Контрольной группе животных вводили фосфатно-солевой буферный раствор (плацебо). Мышей иммунизировали подкожно, однократно. На 4 день у животных собирали макрофаги и при помощи ПЦР в реальном времени определяли в них уровень экспрессии генов IL-1 и TNF. Уровень экспрессии генов выражали в % соотношении, по отношению к контролям.

Наибольшую активность экспрессии генов провоспалительных цитокинов регистрировали при иммунизации мышей иммуностимулирующими комплексами на основе вирусных антигенов, сапонинов и липидов (IL-1 – 100% и TNF – 80%). Достаточно высокий уровень экспрессии цитокинов, регистрировали при иммунизации мышей виросомами и цельным очищенным вирусом, а также наноструктурами хитозана (IL-1 – 90% и TNF – 60%). Наименьшую активность в стимуляции цитокинов наблюдали при иммунизации мышей мицеллами гликопротеидных антигенов вируса гриппа, сорбированных на гидроокиси алюминия (IL-1 – 50% и TNF – 40%) и вирусными гликопротеидными антигенами в форме классических мицелл (IL-1 – 30% и TNF – 20%). При этом, адъювант гидроокись алюминия являлся своеобразным контролем, позволяющим оценить влияние именно формы молекулярной организации вирусного антигена на способность стимулировать воспалительные реакции.

Таким образом, установлено, что активность воспалительного процесса при иммунизации экспериментальных животных различными структурными формами вирусных антигенов в значительной степени зависит от молекулярной структуры вирусного антигена. Наибольшей способностью стимулировать выработку провоспалительных цитокинов и тем самым опосредованно влиять на стимуляцию клеточного иммунитета обладали иммуностимулирующие нанокомплексы, сконструированные на основе очищенных вирусных антигенов, липидов и сапонинов.

Литература:
1. *Кетлинский С.А. Роль Т-хелперов типов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета // Иммунология. - 2002. – Т. 2. - С. 77-79.*
2. *Brunner R., Jensen-Jarolim E., Pali-Schöll I. The ABC of clinical and experimental adjuvants – a brief overview // Immunol Lett. - 2010. - Vol. 128. - P. 29-35. doi: 10.1016/j.imlet.2009.10.005.*

UDC 578.832

INFLUENSE OF THE SUPRAMOLECULAR ORGANIZATION FORM OF VIRAL ANTIGENS AT THEIR ABILITY TO INDUCE OF INFLAMMATORY REACTIONS IN THE ORGANISM

Turmagambetova A.S., Alexyuk P.G., Alexyuk M.S., Zaitceva I.A., Omirtaeva E.S., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.

Institute of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, 103, Bogenbai Batyr Street.
e-mail: aichyck@mail.ru

Immunostimulatory nanocomplexes designed on the basis of purified viral antigens, lipids and saponins possess the greatest ability to stimulate the production of proinflammatory cytokines and thereby indirectly affect the stimulation of cellular immunity.

Key words: viral antigens, inflammation, immune response, form of supramolecular organization.

The biological significance of inflammation and immunity is the delimitation and the elimination of damage

center and pathogenic factors caused it and the reparation of damaged tissues. Proinflammatory cytokines cause inflammation mediated by the cascade of gene products that are not normally produced in the organism of healthy individuals. IL-1 and TNF are inducers of endothelial adhesion molecules. These cytokines are essential for the adhesion of leukocytes to the endothelial surface to the migration into tissues and are the pronounced proinflammatory cytokines [1, 2].

In our research the study of expression of IL-1 and TNF genes by immunization of experimental animals by various structural forms of viral antigens (HA + NA), prepared from influenza virus strain A/Almaty/8/98 (H3N2) was carried out. There are some forms of supramolecular organization of viral antigens: micelles of influenza virus glycoprotein antigens; virosomes - spherical nanoparticles formed by viral glycoprotein antigens and lipids; immunostimulating nanocomplexes - virus-like nanostructures with a diameter of 60 - 80 nm, formed by glycoprotein antigens, lipids, and saponins; nanostructures of chitosan with adsorbed viral glycoproteins; micelles of influenza virus glycoprotein antigens adsorbed to aluminum hydroxide. For comparison, animals were immunized by purified virus particles. Control group of animals were administered the phosphate buffered saline (placebo). Mice were immunized subcutaneously, once. Macrophages were collected on day 4. Level of IL-1 and TNF genes expression was measured using RT-PCR. The level of genes expression expressed in %.

The highest expression of proinflammatory cytokine genes was registered by mice immunization of immunostimulating nanocomplexes based on viral antigens, saponins and lipids (IL-1 – 100% and TNF – 80%). Sufficiently high level of cytokines expression was registered at immunizing of mice by virosomes or purified virus particles, as well as nanostructures of chitosan (IL-1 – 90% and TNF – 60%). The lowest activity of cytokines stimulation was observed by mice immunization of micelles of influenza virus glycoprotein antigens adsorbed to aluminum hydroxide (IL-1 – 50% and TNF – 40%) and viral glycoprotein antigens in the form of classic micelles (IL-1 – 30% and TNF – 20%). In this case, the aluminum hydroxide adjuvant was a kind of control, that allows to evaluate the effect of molecular organization form of viral antigen on the ability to stimulate of inflammatory response.

The activity of inflammation are largely depends on the molecular structure of the viral antigen. Immunostimulating nanocomplexes designed on the basis of purified viral glycoprotein antigens, lipids and saponins possess the highest ability to stimulate the production of proinflammatory cytokines and thereby indirectly affect to the stimulation of cellular immunity.

References:
1. Ketlinskiy S.A. Role of T-helper 1 and T-helper 2 in the regulation of cellular and humoral immunity // Immunology. - 2002. – Vol. 2. - P. 77-79.
2. Brunner R., Jensen-Jarolim E., Pali-Schöll I. The ABC of clinical and experimental adjuvants – a brief overview // Immunol Lett. - 2010. - Vol. 128. - P. 29-35. doi: 10.1016/j.imlet.2009.10.005.

.....

УДК 579.61

ПОЛИСАХАРИД КАРТОФЕЛЯ ГАЛАКТАН В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

Гришин А.В., Лунин В.Г., Карягина А.С.

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия
123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18
e-mail: grishin-a1@yandex.ru

В нескольких экспериментальных моделях показано, что полисахарид картофеля галактан способен подавлять образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa*, а также частично разрушать уже сформированные биопленки. К сожалению, галактан не влияет на минимальные концентрации антибиотиков, необходимые для полной элиминации биопленок *P. aeruginosa*. Тем не менее, галактан картофеля, вероятно, может быть использован для облегчения механического устранения биопленок за счет уменьшения количества биомассы в биопленке.

Ключевые слова: биопленка, *Pseudomonas aeruginosa*, галактан, полисахарид.

Биопленки патогенных бактерий, образовавшиеся в организме больного или на имплантируемых устройствах и катетерах, как правило, не элиминируются терапевтическими дозами антибиотиков, что приводит к развитию хронической инфекции. В связи с этим задача по поиску способов разрушения био-

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

пленок является чрезвычайно актуальной. Одним из наиболее проблемных и часто встречающихся патогенов, образующих биопленки и вызывающих хронические инфекции, является *Pseudomonas aeruginosa*.

Ранее нами было показано, что полисахарид картофеля галактан до некоторой степени подавляет образование биопленок клиническим изолятом *P. aeruginosa* 216 (Grishin et. al, 2013). В данной работе проведено расширенное исследование влияния галактана на процесс образования биопленок *P. aeruginosa*.

Биопленки выращивались в среде M63 с добавлением 1 мМ $MgSO_4$, 0.2% глюкозы и 0.5% казаминовых кислот в течение 24-х часов при температуре 36°C либо в лунках 96-луночных планшетов, либо на полипропиленовых купонах. После культивации биопленки отмывались и окрашивались 0.1% р-ром кристал-виолета.

Оказалось, что галактан картофеля, но не контрольный полисахарид глюкан ячменя в концентрации 0.1% подавлял образование биопленок двух исследованных штаммов *P. aeruginosa* (лабораторного штамма PAO1 и клинического изолята 216) как на стенках 96-луночных планшетов, так и на полипропиленовых купонах. Более того, галактан также оказался способен частично разрушать уже сформированные биопленки штамма PAO1, но не 216.

Определение количества жизнеспособных бактерий в контрольной биопленке и биопленке, культивированной в присутствии галактана показало, что галактан снижает количество жизнеспособных бактерий в биопленке обоих штаммов примерно в 2.5 раза. По-видимому, воздействие галактана на биопленки *P. aeruginosa* связано именно со структурой полисахарида, поскольку добавление эквивалентного количества галактозы не влияет на образование биопленки.

Чтобы определить, позволяет ли подобный эффект галактана элиминировать биопленки *P. aeruginosa* с помощью традиционных антибиотиков, были определены минимальные концентрации трех антибиотиков из разных классов (цефтазидим, ципрофлоксацин и амикацин), необходимые для элиминации биопленки (MBEC, Minimal Biofilm Eradication Concentration), а также влияние галактана на MBEC. В одних экспериментах определялись MBEC антибиотиков при их одновременном применении с 0.1% галактана к сформированным биопленкам. В других экспериментах биопленка предварительно культивировалась в присутствие галактана, после чего определялись MBEC такой «ингибированной» биопленки. Оказалось, что ни совместное применение антибиотиков и галактана, ни применение антибиотиков к «ингибированной» биопленке не изменило значения MBEC ни одного из антибиотиков в отношении ни одного из штаммов. Тем не менее, галактан картофеля, вероятно, может быть использован для облегчения механического устранения биопленок за счет уменьшения количества биомассы в биопленке.

Литература:
1. *Grishin A., Karyagina A.S., Tiganova I.G., Dobrynina O.Yu., Bolshakova T.N., Boksha I.S., Alexeyeva N.V., Stepanova T.V, Lunin V.G., Chuchalin A.G., Ginzburg A.L. Inhibition of* **Pseudomonas aeruginosa** *biofilm formation by LecA-binding polysaccharides. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2013. Vol. 42. № 5. P. 471–2.*

УДК 579.61

POTATO POLYSACCHARIDE GALACTAN AS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM FORMATION INHIBITOR

Grishin A.V., Lunin V.G., Karyagina A.S.

N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia
123098, Moscow, Gamaleya Str., 18
e-mail: grishin-a1@yandex.ru

Potato polysaccharide galactan is shown to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and partially disperse pre-formed biofilms in several assays. Unfortunately, galactan is unable to decrease minimal biofilm eradication concentrations of antibiotics. Nevertheless, potato galactan can probably be used to facilitate mechanical removal of biofilms by decreasing the biofilm biomass.

Key words: biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, galactan, polysaccharide.

Biofilms of pathogenic bacteria that form on patient organs and tissues or implanted devices and catheters are not typically eradicated with therapeutic doses of antibiotics, which leads to the development of chronic infection. This

necessitates the development of methods and/or compounds aimed at biofilm removal. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most problematic and widespread biofilm-forming pathogens that cause chronic infections.

Earlier we demonstrated that potato polysaccharide galactan can inhibit biofilm formation of *P. aeruginosa* clinical isolate 216 to some extent (Grishin et. al, 2013). Here we report further investigation of galactan influence on *P. aeruginosa* biofilm formation process.

Biofilms were cultivated in M63 minimal medium supplemented with 1 mM $MgSO_4$, 0.2% glucose and 0.5% casamino acids for 24 h at 36°C in 96-well plates or on polypropylene coupons. After cultivations biofilms were washed and stained with 0.1% crystal violet.

Potato galactan (0.1% w/v) but not control polysaccharide (barley glucan) inhibited biofilm formation of two *P. aeruginosa* strains used in this study (laboratory strain PAO1 and clinical isolate 216) both on the walls of the wells of 96-well plates and on polypropylene coupons. Moreover, galactan also partially dispersed pre-formed biofilms of PAO1, but not 216.

We further determined the amount of cultivable bacteria in control biofilms and biofilm grown in presence of galactan. Galactan diminished the number of cultivable bacteria by a factor of 2.5. Apparently, the ability of galactan to inhibit biofilm formation relates to the polysaccharide structure, as equivalent amount of galactose did not have any effect of *P. aeruginosa* biofilms.

To determine whether galactan can facilitate the eradication of *P. aeruginosa* biofilms by antibiotics, we determined minimal biofilm eradication concentrations (MBEC) of three antibiotics from different chemical classes (ceftazidime, ciprofloxacin and amikacin), and the effect of galactan on MBECs. In one series of experiments, antibiotics were added to pre-grown biofilms simultaneously with galactan. In another series of experiment antibiotics were added to biofilms, pre-grown in presence of galactan ("inhibited" biofilms). Unfortunately, neither simultaneous use of galactan and antibiotics, nor application of antibiotics to "inhibited" biofilms had any effect on MBEC of any antibiotic. Nevertheless, potato galactan can probably be used to facilitate mechanical removal of biofilms by decreasing the biofilm biomass.

References:

1. *Grishin A., Karyagina A.S., Tiganova I.G., Dobrynina O.Yu., Bolshakova T.N., Boksha I.S., Alexeyeva N.V., Stepanova T.V, Lunin V.G., Chuchalin A.G., Ginzburg A.L. Inhibition of* ***Pseudomonas aeruginosa*** *biofilm formation by LecA-binding polysaccharides. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2013. Vol. 42. № 5. P. 471–2.*

.....

УДК 577.181.7

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛИПОАМИНОКИСЛОТЫ С РАЗЛИЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ КОНЦЕВЫХ АМИНОГРУПП В ПОЛЯРНОМ ДОМЕНЕ

Плотникова К. С., Марусова В. В., Себякин Ю. Л.

Московский Технологический Университет (Институт тонкой химической технологии), Москва, Россия
119571, г. Москва, Проспект Вернадского, д. 86
e-mail: ckairecc@gmail.com

Осуществлен синтез липоаминокислот, обладающих потенциальной антибактериальной активностью и имеющих в своем составе полярный домен со свободными концевыми группами и гидрофобный блок, представленный остатками насыщенных жирных кислот.

Ключевые слова: катионные биоциды; антибиотики; липоаминокислоты; диамины.

Средства против патогенных микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, теряют свою эффективность. Поэтому, в последние несколько десятилетий, возникла необходимость создания новых препаратов для борьбы с резистентными к антибиотикам бактериям. В отличии от антибиотиков, имеющих специфические внутриклеточные мишени, биоциды обладают более широким спектром активности и могут действовать на несколько целей. Катионные биоциды обладают высокой аффинностью к цитоплазматической мембране, что позволяет проявлять бактериостатический или даже бактерицидный эффект. Одним из видов катионных биоцидов являются производные аминов.

Целью данной работы являлась разработка схем получения и синтез таких катионых биоцидов как липоаминокислоты с различной длиной алифатических цепей и спейсером с одной или двумя свободными карбоксильными группами для связывания с соответствующими диаминами.

Синтез осуществляли на основе диэфиров L-глутаминовой и L-аспарагиновой кислот. В качестве по-

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

лярного блока было предложено использование 1,3-диаминопропана и 1,6-диаминогептана. Спейсерами послужили остатки янтарной и малеиновой кислот. Установлено, что антибактериальная активность растет с увеличением числа положительно заряженных групп. За счет увеличения количества полярных остатков, мы добились изменения гидрофильно-липофильного баланса до значений, соответствующих значениям антибактериальных препаратов.

Первоначально осуществляли присоединение гидрофобного блока, роль которого исполняли додециловый, тетрадециловый и гексадециловый спирты, к незащищенной аминокислоте. Затем проводили реакцию присоединения спейсера к свободной аминогруппе путем создания амидной связи за счет активации карбоксильной группы соответствующего кислотного остатка. Далее осуществляли конъюгацию моно-BOC защищенного диамина с производными диэфиров L-глутаминовой или L-аспарагиновой кислот. Защиту удаляли трифторуксусной кислотой. Структуры всех промежуточных и конечных соединений подтверждали данными ИК-, 1Н-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Таким образом, получены новые липоаминокислоты с потенциальной антибактериальной активностью на основе производных L-глутаминовой и L-аспарагиновой кислот с присоединенными к ним диаминами.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных исследований: грант РФФИ 17-04-01141.

УДК 577.181.7

ANTIBACTERIAL LIPOAMINO ACIDS WITH DIFFERENT NUMBER OF TERMINAL AMINO GROUPS IN THE POLAR DOMAIN

Plotnikova K. S., Marusova V. V., Sebyakin Y.L.

Moscow technological university (Institute of fine chemical technology), Moscow, Russia.
86 Vernadsky Avenue, Moscow 119571
e-mail: ckairecc@gmail.com

Synthesis lipoamino acids with potential antibacterial activity, incorporating the polar domain with the free terminal groups and the hydrophobic block presented by residue of saturated fatty acids was carried out.

Key words: cationic biocides; antibiotics; lipoamino acids; diamines.

Medicinal agent against the pathogenic microorganisms having multiple medicinal stability lose the effectiveness. Therefore, in the last several decades, there was a need of creation of new medicines for fight with bacteria having refractory to antibiotics. In difference from the antibiotics having specific intracellular targets, biocides possess wider range of activity and can work on is slightly more whole. Cationic biocides have high affinity with a cytoplasmatic membrane that allows to show bacteriostatic or even bactericidal effect. One of types of cationic biocides are derivants of amines.

The purpose of this work was development of schemes of receiving and synthesis lipoamino acids with various length of aliphatic chains and a spacer with one or two free carboxyl groups for linking with the corresponding diamines.

Synthesis was carried out based on diesters of L-glutamic and L-aspartic acids. As the polar block is offered use 1,3-diaminopropanes and 1,6-diaminoheptanes. Oddments of succinic acid and maleic acid served spacer. It is established that antibacterial activity grows with increase in number of positively charged groups. At the expense increase in quantity of polar oddments, we achieved change of the hydrophilic–lipophilic balance to the values corresponding to values of antibacterial medicines.

Originally carried out connection of the hydrophobic block, whose role is performed dodecyl alcohol, tetradecyl alcohol and hexadecyl alcohol, to the unprotected amino acid. Then carried out addition reaction of a spacer to the free amino group by creation of an amide link due to activation of a carboxyl group of the appropriate acid residue. Further carried out a conjugation of the mono-BOC protected diamine with derivants of diesters of L-glutamic or L-aspartic acids. Protection was deleted with trifluoroacetic acid. Structures of all intermediate and final compounds confirmed with data of IR-spectrometry,1H-NMR-spectroscopy and a mass-spectrometry.

Thus, lipoamino acids with potential antibacterial activity based on derivants of L-glutamic and L-aspartic acids with the diamines attached to them were obtained.

Work is supported by the Russian Federal Property Fund: grant of the Russian Federal Property Fund 17-04-01141.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 577.112.083

ИЗУЧЕНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНОТРОПНОГО ГОМЕОСТАТИЧЕСКОГО ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО БИОРЕГУЛЯТОРА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ЕГО ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА МОДЕЛИ ЛОСКУТНОЙ РАНЫ КОЖИ МЫШИ *IN VIVO*

Гимадиева Д.В.[1], Рыбакова Е.Ю.[2], Мальцев Д.И.[2], Ильина А.П.[3], Ямскова В.П.[2], Ямсков И.А.[3]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, 125047, Москва, Миусская площадь, 9
[2] Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26
[3] Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28
Адрес для переписки: Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28; dina.gimadieva92@bk.ru

На модели лоскутной раны кожи мыши *in vivo* было показано, что для проявления специфической активности МГТБ сыворотки крови КРС необходимо поддержание наноразмерной структуры молекулярного комплекса. Показано, что липиды входящие в состав фракции, содержащей МГТБ сыворотки крови не оказывают влияния на проявление биорегулятором мембранотропной активности, но влияют на результаты специфической активности – процессы ранозаживления.
Ключевые слова: биорегуляторы, белки, липиды, биологичская активность, заживление раны.

Ранее в сыворотке крови животных был обнаружен биорегулятор, принадлежащий группе *мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов* (МГТБ), которые влияют на адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток [1]. Как и все другие МГТБ, биорегулятор, выделенный из сыворотки крови, состоит из белка-модулятора, представленного изоформой сывороточного альбумина, и нескольких пептидов с мол. массой от 1 до 6 кДа. Во фракции изучаемого биологически активного МГТБ, были обнаружены жирные кислоты [2], однако не было изучено их влияние на активность данного МГТБ.

Методом электрофореза в SDS-ПААГ было показано, что в лиофилизованном супернатанте сыворотки крови содержится белок с кажущейся молекулярной массой 66 кДа. Анализ результатов триптического гидролиза показал, что он является членом семейства сывороточных альбуминов. Это соответствует раннее полученным результатам о том, что в состав МГТБ сыворотки крови входит одна из изоформ сывороточного альбумина [3]. Окраска геля суданом черным после электрофореза хлороформ-метанольной вытяжки показала, что в ней присутствуют липиды.

Было показано, что супернатант сыворотки до экстракции проявлял характерную для МГТБ мембранотропную активность (активные концентрации 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-13}, 10^{-14} мг/мл) и сохранял ее после экстракции смесью хлороформ-метанол (10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-14} мг/мл). Липидная фракция также проявляла мембранотропную активность (10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} мг/мл), причем дозовая зависимость не имела полимодального характера.

Методом лазерного динамического светорассеяния было показано, что во фракции супернатанта присутствуют наноразмерные частицы с гидродинамическим радиусом 612±30 нм. После процедуры лиофилизации и экстракции липидов наночастицы не были обнаружены ни в белковой, ни в липидсодержащей фракциях.

На модели лоскутной раны кожи мыши *in vivo* было изучено биологическое действие МГТБ сыворотки крови до и после лиофилизации и экстракции липидов, а также липидсодержащей фракции. На 13 день эксперимента в контрольной группе наблюдали образование фиброзного рубца. Восстановления структур кожи (волосяные фолликулы, потовые железы и т.д.) не наблюдали. В опытной группе О1 (супернатант) наблюдали образование эпителиальных тяжей, которые являются начальной стадией образования волосяных фолликулов [4]. В группе О2 (белковая фракция после лиофилизации и экстракции липидов) наблюдали образование эпидермальных кист, которые могут являться нарушением развития волосяного фолликула [5]. В группе О3 (липидсодержащая фракция после лиофилизации) не наблюдали никаких отличий от контрольной группы.

Из полученных данных можно заключить, что для проявления специфической активности МГТБ сыворотки крови необходимо поддержание наноразмерной структуры молекулярного комплекса. Также в

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

данной работе было показано, что липиды входящие в состав фракции, содержащей МГТБ сыворотки крови не оказывают влияния на проявление биорегулятором мембранотропной активности, но влияют на результаты специфической активности – процессы ранозаживления.

Литература:
1. *Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биол. – 1991. - Т. 52, № 2. - С. 181-191.*
2. *Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V., Yamskov I.A. Analysis of Regulatory Proteins from Bovine Blood Serum that Display Biological Activity at Ultra Low Doses: 1. Isolation, Purification and Physicochemical Properties // In the book "Biochemical Physics Frontal Research". Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov. Hauppauge NY. Nova Science Publishers Inc. 2007. P. 61-70.*
3. *Ямскова В.П. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков И.А. – Saarbrucken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 136 P.*
4. *Paus R, Muller-Rover S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmuller S, Ling G, Hofmann U, Foitzik K, Mecklenburg L, Handjiski B. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. // J Invest Dermatol. – 1999. - 113(4). – P.523-532.*
5. *Peckham J.C. Skin and subcutis /J.C. Peckham, K. Heider // Pathology of the Mouse: Reference and Atlas, Ed. by R.R. Maronpot, G.A. Boorman, B.W. Gaul.– Vienna IL: Cache River Press, 1999.– P.555–612.*

УДК 577.112.083

STUDYING OF REGENERATIVE PROPERTIES OF MEMBRANOTROPIC HOMEOSTATIC TISSUE-SPECIFIC BIOREGULATOR FROM BOS TAURUS BLOOD SERUM ON MOUSE FLAP WOUND MODEL IN VIVO

Gimadieva D.V.[1], Rybakova E.U.[2], Maltsev D.I.[2], Ilyina A.P.[3], Yamskova V.P.[2], Yamskov I.A.[3]

[1] D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125047, Moscow, Miusskaya Sq., 9
[2] Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences (IDB RAS), Russia, 119334, Moscow, Vavilova St., 26
[3] A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences (INEOS RAS), Russia, 119991, Moscow, Vavilova St., 28
Mailing address: Russia, 119991, Moscow, Vavilova St., 28; dina.gimadieva92@bk.ru

On mouse flap wound model *in vivo* it was shown that for evincing of specific blood serum MHTB bioactivity nanoparticles of molecular complex have to be preserved. Lipids found in composition of MHTB don't seem to be affecting the membranotropic activity but do affect specific activity (wound healing).

Key words: bioregulators, proteins, lipids, bioactivity, wound healing.

In animal blood serum there was found a bioregulator pertaining to membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators (MHTB) which has influence on adhesion and cell migration, proliferation and differentiation [1]. As well as other MHTB, the one from blood serum consists of modulating protein which represents the isoform of serum albumin and few peptides with molecular masses from 1 to 6 kDa. In the fraction of current MHTB fatty acids were found [2] but their effect on bioactivity of this MHTB hasn't yet been studied.

Using gel electrophoresis fraction of freeze-dried supernatant of blood serum was shown to contain the protein of apparent molecular mass of 66 kDa. The tryptic hydrolysate analysis has shown this protein to be the member of serum albumin family which corresponds previously obtained data [3]. Dying the electrophoretic gel with sudan stain has shown the fraction of chloroform-methanol extract to contain lipids.

The fraction of supernatant has been evincing distinctive to MHTB membranotripic activity (in active concentrations 10-6, 10-7, 10-13, 10-14 mg/ml) and maintained it after the extraction of lipids with chloroform-methanol mixture (10-6, 10-7, 10-14 mg/ml). The fraction of lipids also has shown this activity but without multimodal type dependency.

Using dynamic light scattering method the fraction of supernatant was shown to have nanoparticles with hydrodynamic radius of 612±30 nm. After freeze-drying and lipid extraction there weren't any nanoparticles found neither in the protein-containing nor in the lipid-containing fractions.

Specific bioactivity of blood serum MHTB was studied on mouse flap wound model in vivo for all of the obtained fractions (supernatant O1, protein-containing fraction obtained after freeze-drying and lipid extraction O2,

lipid-containing fraction O3). On the 13th day of experiment in the control group there was observed the formation of fibrosis scars without any signs of recovery of functional structures of skin (hair follicles, sweat glands, etc.). In experimental group O1 epithelial projections were observed which can be the starting point for hair follicle formation [4]. In experimental group O2 formation of epidermal cysts was revealed which can be defection in hair follicle formation. For experimental group O3 there weren't observed any differences form control group.

According to obtained results it can be stated that specific bioactivity of blood serum MHTB can only be evinced if nanostructure of molecular complex is maintained. In this study it was also shown that lipids comprised in the blood serum MHTB-containig fraction do not affect membranotropic activity but do affect specific bioactivity (wound healing).

References:

1. *Yamskova V.P., Reznikova M.M. // Joural of general boil. 1991. Vol. 5. № 2. P. 181-191.*
2. *Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V., Yamskov I.A. Analysis of Regulatory Proteins from Bovine Blood Serum that Display Biological Activity at Ultra Low Doses: 1. Isolation, Purification and Physicochemical Properties // In the book "Biochemical Physics Frontal Research". Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov. Hauppauge NY. Nova Science Publishers Inc. 2007. P. 61-70.*
3. *Yamskova V.P. New experimental and theoretic aspects in bioregulation. Mechanism of membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators. – Saarbrucken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 136 P.*
4. *Paus R, Muller-Rover S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmuller S, Ling G, Hofmann U, Foitzik K, Mecklenburg L, Handjiski B. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. // J Invest Dermatol. 1999. Vol. 113(4). P.523-532.*
6. *Peckham J.C. Skin and subcutis /J.C. Peckham, K. Heider // Pathology of the Mouse: Reference and Atlas, Ed. by R.R. Maronpot, G.A. Boorman, B.W. Gaul.– Vienna IL: Cache River Press, 1999. P.555–612.*

УДК 577.152.34

ВЫСОКОАКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ПРОТЕИНАЗ С ВЫРАЖЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ К ФИБРИЛЛЯРНЫМ БЕЛКАМ

Бедненко Д.М., Попова Е.А, Осмоловский А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1,
e-mail: bi17bi03da@mail.ru

Изучено образование протеолитических ферментов с выраженной активностью к фибриллярным белкам: коллагену, фибрину и эластину у трех активных продуцентов протеиназ *Aspergillus ustus* 1, *A. fumigatus* O-1 и *Cladosporium cladosporioides* 1. Показано, что *C. cladosporioides* 1 является наиболее перспективным продуцентом протеиназ из трех рассматриваемых штаммов.

Ключевые слова: протеолитические ферменты; протеиназы; микромицеты; фибриллярные белки.

В настоящее время значительная часть биотехнологии посвящена получению ферментных препаратов. Их производство постоянно растет, а сфера применения расширяется. Протеиназы используются в самых различных отраслях: в медицине, пищевой и легкой промышленности. Таким образом, микромицеты, как активные продуценты различных протеиназ являются перспективным объектом для исследований. В ходе первичного скрининга, используемые в работе штаммы были отобраны как активные продуценты протеолитических ферментов с выраженными активностями к фибриллярным белкам: коллагену, фибрину, эластину [1, 2, 3]. Наличие выраженной активности именно к фибриллярным белкам является важным условием поиска протеиназ. Большинство индивидуальных белков человека являются глобулярными белками, поэтому наличие активности к глобулярным белкам накладывает серьезные ограничения на возможность медицинского и промышленного применения протеолитических ферментов из-за токсичности и возможности возникновения аллергических реакций.

Для исследования были использованы штаммы *Aspergillus ustus* 1, *A. fumigatus* O-1 и *Cladosporium cladosporioides* 1 из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова.

Определение протеолитической активности осуществляли на чашках Петри со средой состава (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, $MgSO_4$ – 0,25, пептон – 5,0, казеинат натрия/ желатин/ фибрин/ эластин – 10,0, агар – 15,0. Через 7 дней измеряли зоны гидролиза и размер колоний. Также, микромицеты культивировали на орби-

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

тальной качалке (200 об/мин) в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл среды при 28°С в течение 2 дней на посевной среде состава (в %): сусло – 6,7, глюкоза – 2,0, пептон – 0,1. Затем в течение 5 дней при той же температуре на среде (в %) – глюкоза 3,0, глицерин – 7,0, гидролизат рыбной муки – 0,5, $NaNO_3$ – 0,2, KH_2PO_4 – 0,05, $MgSO_4$ – 0,05. Измерение коллагенолитической активности проводили в отфильтрованной культуральной жидкости при 37°С с субстратом азоколлом фирмы CALBIOCHEM в концентрации 1мг/мл 0,05 М Трис-HCl буфера (pH 8,2). Активности выражали в мкг азоколлагена/мл/мин.

Биотехнологический потенциал (БП) на среде с коллагеном у *A. ustus* 1 составил 0,583, у *A. fumigatus* О-1 – 0,444, а у *C. cladosporioides* 1 почти в два раза меньше – 0,26. Самый высокий биотехнологический потенциал на среде с эластином оказался у *C. cladosporioides* 1 – 0,833. Гораздо меньше значения для *A. ustus* 1 – 0,133. Для *A. fumigatus* О-1 БП на среде с эластином еще меньше. Для фибрина – самые высокое значение БП также наблюдалось для *C. cladosporioides* 1 – 0,2, а для *A. ustus* 1 и *A. fumigatus* О-1 эти значения составили 0,123 и 0,133 соответственно. Самое низкое значение биотехнологического потенциала на среде с казеином (общая протеолитическая активность) было у *A. ustus* 1 – 0,309, а самое высокое (почти в три раза больше) – у *A. fumigatus* О-1 – 0,985. У *C. cladosporioides* 1 это значение составило 0,71.

Коллагенолитическая активность *A. fumigatus* О-1 и *C. cladosporioides* 1 оказались приблизительно одинаковыми - 0,09 и 0,1 мкмоль азоколла/мл/мин соответственно, а активность *A. ustus* 1 составила 0,07 мкмоль азоколла/мл/мин.

Таким образом, *C. cladosporioides* 1 оказался самым перспективным из трех рассматриваемых штаммов, биотехнологический потенциал на среде с фибрином и эластином оказались самыми высокими из всех, коллагенолитическая активность также была достаточно высокой. Общая протеолитическая активность этого микромицета была не самой высокой среди рассматриваемых штаммов, что возможно указывает на специфичность вырабатываемых протеиназ к фибриллярным белкам.

Литература:

1. *Reichard U., Buttner S., Eiffert H., Staib F., Ruchel R. Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from Aspergillus fumigatus and its detection in tissue//J. Med. Microbiol. – 1990. – Vol. 33. №4. – P. 243-251.*
2. *Попова Е.А., Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Егоров Н.С. Образование протеиназ с коллагенолитической и фибринолитической активностью микромицетами Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus и Aspergillus ustus в условиях твердофазного культивирования // Современная микология в России. – 2015. – Т 5. – с. 339–340.*
3. *Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Скрининг продуцентов протеиназ с фибринолитической и коллагенолитической активностями среди микромицетов // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 3. – с. 316–322*

УДК 577.152.34

HIGHLY ACTIVE PRODUSERS OF PROTEINASES WITH AIMING ACTIVITY TO FIBRILLAR PROTEINS

Bednenko D.M., Popova E.A., Osmolovskiy A.A.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory, 1
e-mail: bi17bi03da@mail.ru

The production of proteolytic enzymes with aiming activity to fibrillar proteins: collagen, fibrin and elastin was studied among the three active producers of proteases: *Aspergillus ustus* 1, *A. fumigatus* O-1 and *Cladosporium cladosporioides* 1. It was shown that *C. cladosporioides* 1 is the most promising of the three examined strains.

Key words: proteolytic enzymes, proteases, micromycetes, fibrillar proteins.

Currently, a big part of biotechnology is devoted to the production of enzymes. It is constantly growing and application scope is expanding. Proteases are wildly used in different fields: medicine, food and light industry. Thus, micromycetes, as active producers of various proteases, are promising target for research. During the primary screening, strains, that are used in this work, were selected as active producers of proteolytic enzymes with aiming activities to fibrillar proteins: collagen, fibrin, elastin [1, 2, 3]. The presence of aiming activity specifically to fibrillar proteins is very important in proteinase searching. The majority of human proteins are globular proteins, that is why

activity to globular proteins imposes restrictions on the possibilities of medical and industrial application of the proteinase due to toxicity and the potential for allergic reactions.

The study was performed with micromycetes *Aspergillus ustus* 1, *A. fumigatus* O-1 and *Cladosporium cladosporioides* 1 from the collection of the Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University.

Determination of proteolytic activity were performed on a Petri dish with culture medium (g/l): KH_2PO_4 – 0,5, $MgSO_4$ – 0.25, peptone – 5.0, sodium caseinate/ gelatin/ fibrin/ elastin – 10.0, agar – 15,0. After 7 days the hydrolysis area and the size of colonies were measured. Also, the micromycetes were cultured on an orbital shaker (200 rev/ min) at 28°C in 750 ml flasks containing 100 ml of culture medium for 2 days. The medium had the following composition (%): wort – 6.7, glucose – 2.0, peptone – 0.1. Then micromycetes were cultured for another 5 days at the same temperature in a culture medium containing (%): glucose – 3.0, glycerin – 7.0, fish flour hydrolysate – 0.5, $NaNO_3$ – 0.2, KH_2PO_4 – 0.05, $MgSO_4$ – 0.05. Collagenolytic activity measurement was performed at 37°C in the filtered culture fluid with azocoll (CALBIOCHEM) as substrate at a concentration of 1 mg/ml 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.2). One unit of activity of the enzyme was estimated in 1 μg of azocollagen/ml/min.

Biotechnological potential (BP) of *A. ustus* 1 in collagen containing culture medium was 0.583, of *A. fumigatus* O-1 – 0.444, and for *C. cladosporioides* 1 is was almost half as much – 0.26. The highest biotechnological potential in elastin containing culture medium was observed for *C. cladosporioides* 1 – 0.833. For *A. ustus* 1 the value was much less – 0.133. For the *A. fumigatus* O-1 BP was even less. For fibrin containing culture medium the highest value of BP was also observed for *C. cladosporioides* 1 – 0.2, for *A. ustus* 1 and *A. fumigatus* O-1, these values were 0.133 and 0.123 respectively. The lowest value of the biotechnological potential of casein containing culture medium (total proteolytic activity) was observed for *A. ustus* 1 – 0.309, and the highest (almost three times more) – for *A. fumigatus* O-1 – 0.985. The value for *C. cladosporioides* 1 was 0.71.

Collagenolytic activity for *A. fumigatus* O-1 and *C. cladosporioides* 1 were approximately the same – 0.1 and 0.09 μg of azocoll/ml/min, respectively, and the activity for *A. ustus* 1 was 0.07 μg of azocoll/ml/min.

Thus, *C. cladosporioides* 1 turned out to be the most promising of the three examined strains, it's biotechnological potentials in the culture medium with fibrin and elastin were the highest, collagenolytic activity was also relatively high. Total proteolytic activity of this micromycete was not the highest among the examined strains and that may indicate the specificity of produced proteases to fibrillar proteins.

References.

1. *Reichard U., Buttner S., Eiffert H., Staib F., Ruchel R. Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from Aspergillus fumigatus and its detection in tissue//J. Med. Microbiol. 1990. – Vol. 33. №4. – P. 243-251.*
2. *Popova E.A., Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Egorov N.S. Production of proteinases with collagenolytic and fibrinolytic activity by micromycetes Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus and Aspergillus ustus in solid-state fermentation // Sovremennaya micologia in Russia. – 2015. – Vol. 5. – P. 339–340.*
3. *Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. – 2015. – Vol. 84. № 3, – P. 316–322.*

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ХРАНЕНИЕ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *STREPTOMYCES*

Синёва О.Н., Терехова Л.П.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11
e-mail: olga.sineva81@yandex.ru

Изучено влияние низких температур -70^{0}С на выживаемость и антибиотическую активность актинобактерий рода *Streptomyces*. Исследование показало, что стрептомицеты полностью сохраняют жизнеспособность после двух лет хранения при температуре -70^{0}С. Замораживание не оказало существенного влияния на антибиотическую активность исследуемых штаммов.

Ключевые слова: актинобактерии, жизнеспособность, антибиотическая активность, хранение.

Поддержание штаммов в рабочем состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

условиями работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов. Одним из современных способов хранения микроорганизмов является замораживание и хранение культур в условиях низких температур от -20^{0}C до -85^{0}C, стабильное поддержание которых обеспечивают современные лабораторные холодильники. Техника проведения замораживания довольно проста: культуры микроорганизмов выращивают на специализированных агаровых средах до стационарной фазы, затем смывают защитной средой или дистиллированной водой с добавлением криопротектора, криопробирки с клеточными суспензиями помещают в низкотемпературный холодильник. Литературные сведения об эффективности данного метода немногочисленны, подобные исследования в отношении актиномицетов рода *Streptomyces* ранее не проводились.

Цель данного исследования – изучить влияние низкотемпературного замораживания -70^{0}C на выживаемость и сохранения антибиотических свойств 9 штаммов стрептомицетов.

Концентрация споровых суспензий стрептомицетов в опытных образцах составила 10^7-10^8 КОЕ/мл. В качестве криопротектора использовали 10% р-р глицерина. Для оценки влияния криопротектора на выживаемость стрептомицетов, контрольные образцы споровых суспензий были заморожены без криопротектора. В качестве тест-организмов использовали культуры *Staphylococcus aureus* FDA 209 P, *Micrococcus luteus* ATTC 9341, *Bacillus subtilis* ATTC 6633.

Исследование показало, что стрептомицеты практически полностью сохраняют жизнеспособность после двух лет хранения при температуре -70^{0}C. Изучение влияния замораживания на антибиотическую активность стрептомицетов в отношении тест-микроорганизмов показало, что штаммы, изначально обладающие антибиотической активностью, сохраняют ее на высоком уровне 95-97% в течение всего периода хранения. Было установлено, что криопротектор не оказывает влияния на выживаемость и антибиотическую активность изученных штаммов стрептомицетов.

.....

LOW TEMPERATURE STORAGE OF ACTINOBACTERIA OF GENUS *STREPTOMYCES*

Sineva O.N., Terekchova L.P.

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia
119021, Moscow, str. Bol'shaya Pirogovskaya, 11
e-mail:olga.sineva81@yandex.ru

The influence of low temperatures (-70^{0}C) on the survival and antibiotic activity of actinobacteria of genus *Streptomyces* was studied. The research showed that streptomycetes almost completely saved viability after storage at temperature -70^{0}C for two years. Freezing had no influence on antibiotic activity of strains of streptomecetes.

Key words: actinobacteria, viability, antibiotic activity, storage.

The maintenance of strains and preservation of their valuable properties are the important conditions of all activity with microorganisms from initial research to use their in biologics production. Low temperature freezing and storage of cultures of microorganisms in freezers at temperatures -20^0-85^{0}C is one of the modern method of storage of microorganisms. The technique of freezing is quite simple: cultures of microorganisms are grown on the agar medium to stationary phase and then washed with using the protective medium or sterilized water with crioprotectant. After that cryovials with cell suspensions are put in low-temperatures freezer. The literature data of efficiency at the present method of storage are not numerous. The researches in relation to actinomycetes of genus of *Streptomyces* haven't been done yet.

The aim of our research was to study the influence of low temperatures freezing on the survival and saving antibiotic activity against test-microorganisms of 9 strains of streptomecetes.

Spores concentration of streptomycetes in suspension was 10^7-10^8 CFU/ml. 10% glycerol solution was used as crioprotectant. The control samples suspensions of streptomycetes was freezed without crioprotectant in order to estimate the influence of crioprotectant on the survival rate of streptomycetes. *Staphylococcus aureus* FDA 209 P, *Micrococcus luteus* ATTC 9341, *Bacillus subtilis* ATTC 6633 were used as test-organisms.

The study showed that streptomycetes almost completely saved its viability after storage at temperature -70^{0}C for two years. Research of freezing influence on antibiotic activity against test-microorganisms showed

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

that the strains, that had activity originally, had saved antibiotic activity on high level 95-98% during all period storage. The obtained data showed that the crioprotectant had no influence on the storage and antibiotic activity studied strains of streptomecetes.

УДК 577.25+612.822.56

НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ПОВЫШЕНИЕМ СИНТЕЗА В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ МОЗГА КРЫС ШАПЕРОНА GRP78

Заколюкина Е. С., Тукмачева К. А., Сергеев В. Г.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия
426034, Ижевск, ул. Университетская, д. 1, корп. 1.
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия
426034, Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281
e-mail: alena-immun@yandex.ru

Рассматривается и экспериментально обосновывается возможность использования некоторых полифенольных соединений в качестве перспективных эффективных средств в терапии нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, стресс эндоплазматической сети, шаперон GRP78, нейропротекция.

Широкая распространенность нейродегенеративных заболеваний, неуклонная тенденция к увеличению числа больных и отсутствие эффективных методов ранней диагностики и этиотропных способов лечения определяют необходимость разработки новых принципов нейропротективной терапии, основанных на понимании тонких молекулярно-клеточных механизмов патогенеза этих заболеваний.

Одним из ключевых патофизиологических механизмов нейродегенеративных заболеваний является накопление и последующая агрегация в нервных клетках неправильно свернутых белков, вызывающих стресс эндоплазматической сети и интегральный клеточный ответ (unfolded protein response, UPR) [1], направленный на их элиминацию. Ключевую роль в механизмах такой реакции играет глюкозозависимый белок-шаперон GRP78 (BiP) [2, 3]. Ранее мы обнаружили, что у старых крыс снижена экспрессия шаперона GRP78, что в значительной мере усиливает нейротоксичность интранигрально вводимого эндотоксина, в то время как экспериментальное повышение экспрессии в дофаминергических нейронах GRP78 посредством введения в черную субстанцию мозга крыс рекомбинантного вируса, несущего соответствующий ген, оказывает достоверный нейропротективный эффект.

Результаты проведенных исследований позволили сосредоточить наше внимание на поиске фармакологических средств, способных осуществлять специфическое и эффективное повышение в дофаминергических нейронах уровня синтеза шаперона GRP78, при этом обладать способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер и не оказывать побочного действия на клетки нервной ткани. Мы предполагаем, что в качестве таких средств могут быть использованы некоторые полифенольные соединения (например, магнолол, хонокиол), в настоящее время применяющиеся в качестве разрешенных биологически активных добавок с противовоспалительным и противоопухолевым действием. Для проверки этого предположения было выполнено исследование по ежедневному однократному пероральному введению старым крысам (в возрасте 40 недель) в течение 2 месяцев 0,1% - ного водного раствора магнолола. Иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга черной субстанции крыс антителами к тирозингидроксилазе, CD11b и GRP78 продемонстрировало выраженный нейропротективный эффект такой терапии: снижение интенсивности провоспалительной активации микроглии и нейродегенерации у старых животных в модели индуцированной болезни Паркинсона, по сравнению с животными, не получавшими раствора полифенола. В выживающих дофаминергических нейронах отмечалось достоверное повышение экспрессии шаперона GRP78. Таким образом, магнолол можно рассматривать в качестве возможного эффективного нейропротективного средства.

Литература:
1. Lai E., Teodoro T., Volchuk A. Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response // Physiology.

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

2007. № 22. P. 193-201.
2. Дедов И. И., Смирнова О. М., Горелышев А. С. Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 5. – С.57-65.
3. Gorbatyuk M. S., Gorbatyuk O. S. The Molecular Chaperone GRP78 / BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review // Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy. 2013. Vol. 11. № 4 (2).
UDC 577.25+612.822.56

NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS, DUE TO AN INCREASE SYNTHESIS OF CHAPERONE GRP78 (BIP) IN DOPAMINERGIC NEURONS OF THE SUBSTANTIA NIGRA RAT BRAIN

Zakolyukina E. S., Tukmacheva K. A., Sergeev V. G.

Udmurt State University, Izhevsk, Russia
426034, Izhevsk, st. Universitetskaya 1
Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia
426034, Izhevsk, st. Kommunarov 281
e-mail: alena-immun@yandex.ru

There are considered and justified experimentally the possibility of using some polyphenolic compounds (magnolol) as an effective means of perspective in the treatment of neurodegenerative diseases.

Key words: Parkinson's disease, endoplasmic reticulum stress, GRP78, neuroprotection.

The prevalence of neurodegenerative diseases, steady trend towards an increase in the number of patients and the lack of effective methods for early diagnosis and treatments etiotropic determine need for new principles of neuroprotective therapy, based on an understanding of subtle molecular-cellular mechanisms of the pathogenesis of these diseases.

One of the key pathophysiological mechanisms of neurodegenerative diseases is the accumulation and subsequent aggregation of the unfolded and misfolded proteins in nerve cells in that cause endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response, UPR [1]. Another factor that contributes significantly to endoplasmic reticulum stress is the lack of activity of the chaperone, and the glucose regulated protein 78 (GRP78), also known as BiP plays a key role [2, 3]. Previously, in our works, we found that expression of the chaperone GRP78 reduced in neurons of the substantia nigra of the brain of old rats, which can serve as a predisposing factor for the development of neurodegenerative diseases associated with aging, including Parkinson's disease. Increased of expression of GRP78, experimentally induced transfer of a viral vector carrying the gene, significantly reduces the intensity of neurodegeneration in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the brain of rats.

The results of the research allowed to focus our attention on the need to find pharmacological agents capable of carrying out specific and effective increase in the dopaminergic neurons of the level of synthesis of the chaperone GRP78, thus be able to overcome the blood-brain barrier and has no side effects on nerve tissue cells. We assume that some polyphenolic compounds (magnolol, honokiol) can be used in this capacity, but nowadays this compounds are currently used as permitted dietary supplements with anti-inflammatory and anti-tumor effect. To test this hypothesis we conducted research on the daily oral injection to old rats (at the age of 40 weeks) for 2 months 0.1% aqueous solution of magnolol. Immunohistochemical staining of brain sections of substantia nigra of rats by tyrosine hydroxylase antibody, CD11b antibody and GRP78 antibody demonstrated pronounced neuroprotective effect such treatment: a decrease proinflammatory intensity microglial activation and neurodegeneration in old animals in model of Parkinson's disease, as compared with animals which haven't receive solution of polyphenol. There was a significant increase in the expression of the chaperone GRP78 in the surviving dopaminergic neurons. Therefore, the magnolol may be considered as a possible effective neuroprotective agent.

References:
1. Lai E., Teodoro T., Volchuk A. Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response // Physiology. 2007. № 22. P. 193-201.
2. Dedov I. I., Smirnova O. M., Gorelyshev A. S. Endoplasmic Reticulum Stress: the cytological "scenario" of pathogenesis of human diseases // Problems of endocrinology. 2012. № 5. P. 57-65.
3. Gorbatyuk M. S., Gorbatyuk O. S. The Molecular Chaperone GRP78 / BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review // Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy. 2013. Vol. 11. № 4 (2).

УДК 57.017.35

РАЗРАБОТКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННОГО ЖЕЛЧНОГО ПРОТОКА

Демченко А.Г. [1], Люндуп А.В.[1], Дюжева Т.Г. [1], Клабуков И.Д. [1], Крашенинников М.Е. [1], Шепелев А.Д. [2], Тенчурин Т.Х. [2]

[1] Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Институт регенеративной медицины, Москва, Россия
[2] Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия 119992, Москва, ул. Трубецкая, д. 8
email: demchenkoann@yandex.ru

Проведены исследования в области создания прототипа тканеинженерной конструкции (ТИК) желчного протока на основе синтетического каркаса, с использованием первичных клеточных культур.

Ключевые слова: тканевая инженерия; регенеративная медицина; биодеградируемые матриксы; биомедицинский клеточный продукт; желчный проток; стволовые клетки; эпителиоциты желчного протока.

Актуальность проблемы поиска новых способов восстановления повреждений желчных протоков (ЖП) с использованием современных материалов и способов их получения (1-2) обусловлена высокой частотой их повреждений (0,08-2,7% от общего числа холецистэктомий) и серьезными осложнениями после используемых реконструктивных операций.

Цель исследования: Разработка прототипа ТИК для восстановления поврежденного желчного протока.

Материал и методы: Использовали биосовместимые и биодеградируемые материалы на основе сополимера поликапролактона и полимолочной кислоты, из которых методом электроспиннинга изготавливали трубчатый многослойный каркас с механической прочностью равной нативному ЖП, а также с устойчивостью к модельным биологическим средам, включая желчь, in vitro (3). Наружный и внутренний слои каркаса заселяли, соответственно, мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга (МСК КМ) и эпителиоцитами желчного протока (ЭЖП) человека. Заселение матриксов клетками осуществляли по методу динамическом культивирования, которое, как показали наши ранее выполненные исследования (4), было эффективнее статического.

Результаты: С помощью конфокальной микроскопии была подтверждена адгезия и пролиферация ЭЖП и МСК КМ в соответствующих слоях конструкции. Показано, что динамический способ культивирования повышает эффективность заселения. Определен высокий уровень жизнеспособности клеток в составе ТИК (84-95% при окраске live/dead). Механические свойства ТИК достоверно не отличаются от композитного каркаса конструкции.

Заключение: Были разработаны методы создания прототипа ТИК ЖП на основе сформованных электроспиннингом многослойных композитных каркасов и клеточного компонента, состоящего из ЭЖП и МСК КМ. На следующем этапе ТИК будут исследованы на животных на безопасность и эффективность их применения.

Литература:

1. *Zong C, Wang M, Yang F. A novel therapy strategy for bile duct repair using tissue engineering technique: PCL/PLGA bilayered scaffold with hMSCs //Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. - 2015.*
2. *Дюжева Т.Г., Люндуп А.В., Клабуков И.Д., Чвалун С.Н., Григорьев Т.Е. Шепелев А.Д., Тенчурин Т.Х., Крашенинников М.Е., Оганесян Р.В. Перспективы создания тканеинженерного желчного протока //Гены и клетки. - 2016. - Т.11, №1 - С. 43-47.*
3. *Шепелев А.Д., Тенчурин Т.Х., Чвалун С.Н., Григорьев Т.Е., Дюжева Т.Г, Люндуп А.В. et al. Каркас для протезирования желчного протока //Патент на полезную модель RUS № 163630 29.12. 2015*
4. *А.В. Люндуп, А.Г. Демченко, Т.Х. Тенчурин, М.Е. Крашенинников И.Д. Клабуков, А.Д. Шепелев, В.Г. Мамагулашвили, Р.В. Оганесян, А.С. Орехов, С.Н. Чвалун, Т.Г. Дюжева. Повышение эффективности заселения биодеградируемых матриксов стромальными и эпителиальными клетками при динамическом культивировании //Гены и клетки. – 2016. – Т.11, №3 – С. 102-107.*

UDC 57.017.35

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

THE DEVELOPMENT OF TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCTS TO REPAIR DAMAGED BILE DUCT

Demchenko A.G.[1], Lyundup A.V. [1], Dyuzheva T.G. [1], Klabukov I.D. [1], Krasheninnikov M.E. [1], Shepelev A.D. [2], Tenchurin T.H. [2]

[1] I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine, Moscow, Russia
[2] National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia 8-2 Trubetskaya st., Moscow 119991, Russia
email: demchenkoann@yandex.ru

The research in the field of tissue-engineered constructs (TEC) of bile duct by a synthetic frame with primary cell cultures.

Key words: tissue engineering; regenerative medicine; biodegradable matrices; biomedical cell product; bile duct; stem cells; epithelial cells of the bile duct.

Due to the high frequency of injuries (0,08-2,7% of the total number of cholecystectomies) and serious complications after reconstructive operations, new methods to restore damaged bile ducts with modern materials and their production (1-2) are highly desired.

The aim of the study was to develop a prototype of the TEC to repair damaged bile duct.

Material and methods: The study used the biocompatible and biodegradable materials based on copolymer of polycaprolactone and polylactic acid, which electrospinning produced multilayer tubular frame with a mechanical strength equal to the native bile duct, as well as with resistance to model biological environments, including bile, in vitro (3). The outer and inner layers have settled, respectively, with mesenchymal stem cells from bone marrow (BM-MSCs) and with bile duct epithelial cells (BDEC). The colonization of the matrices with cells was carried out according to the method of dynamic cultivation, which was proved to be more effective than static by our previously performed study (4).

Results: Confocal microscopy confirmed that BM-MSCs and BDEC adhered and proliferated in the respective layers of the structure. It is shown that the dynamic culture method improves the efficiency of settlement. High level of cell viability in the TEC (84-95% live/dead staining) was also detected, while mechanical properties of TECs were not significantly different from the composite frame structure.

***Conclusion**: The methods of constructing the prototype of TEC BD based on electrospinning molded multilayer composite scaffolds and the cellular component consisting of BDEC and BM-MSCs were developed and proved. In the next stage the TECs will be investigated for safety and efficacy of their application in animals.*

References

1. *Zong C, Wang M, Yang F. A novel therapy strategy for bile duct repair using tissue engineering technique: PCL/PLGA bilayered scaffold with hMSCs //Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. - 2015.*
2. *Dyuzheva T.G., Lyundup A.V., Klabukov I.D., Chvalun S.N., Grigorev T.E., Shepelev A.D., Tenchurin T.H., Krasheninnikov M.E., Oganesyan R.V. Prospects for tissue engineered bile duct //Genes and cells. - 2016. - V.11, №1 - P. 43-47.*
3. *Shepelev A.D., Tenchurin T.H., Chvalun S.N., Grigorev T.E., Dyuzheva T.G., Lyundup A.V. et al. Frame for prosthesis bile duct //The patent for useful model RUS № 163630 29.12. 2015*
4. *Lyundup A.V., Demchenko A.G., Tenchurin T.H, Krasheninnikov M.E, Klabukov I.D., Shepelev A.D., Mamagulashvili V.G., Oganesyan R.V., Orekhov A.S., Chvalun S.N., Dyuzheva T.G. Improving the efficiency of settlement in biodegradable matrices of stromal and epithelial cells in dynamic culture //Genes and cells. – 2016. – V.11, №3 – P. 102-107.*

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 573.6.086.83

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА, СТРОЕНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГРИБА ШИИТАКЕ (LENTINULA EDODES)

[1]Новиков В.И., [2]Мальцев Д.И., [2]Ямскова В.П., [1]Ямсков И.А.

[1]ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия
[2]ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
e-mail: novikovwork93@gmail.com

В данной работе в плодовом теле гриба шиитаке (*lentinula edodes*) идентифицированы МГТБ-подобные (мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы) вещества, изучена их биологическая активность на модели роллерного органотипического культивирования и показана мембранотропная активность, характерная для биорегуляторов данной группы. Показано что изучаемые вещества в растворах существуют в наноразмерном состоянии и способны оказывать влияние на вязко-упругие свойства плазматических мембран клеток печени мыши *in vitro.* А также стимулируют активность макрофагов печени тритона *in vitro.*

Ключевые слова: биорегулятор, гриб шиитаке, печень тритона, наночастицы.

В настоящее время особое внимание уделяется веществам природного происхождения, а среди них - получаемых из растений и грибов. Например, из грибов были выделены полисахариды (лентинан, гетерогалактан и др.) на основе которых созданы эффективные лекарственные препараты [1]. Отмечено, что экстракты грибов проявляют широкий спектр биологической активности, в том числе, показывают гепатопротекторное действие [2].

В этом аспекте значительный интерес вызывает новая группа биорегуляторов - мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ), которые были обнаружены ранее во многих тканях млекопитающих, растений, а также в культуральной среде микромицеллия (*fusarium s)* [3]. Следует отметить, что в растворах они присутствуют в виде крупных наноразмерных частиц (более 100 нм) [4].

Целью настоящей работы явилась идентификация в межклеточном пространстве плодового тела высшего гриба шиитаке (*lentinula edodes*) МГТБ-подобных веществ, исследование ряда их физико-химических свойств и биологической активности, которая была изучена на модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* [7]. В процессе выделения и очистки МГТБ-подобных веществ их присутствие во фракциях определяли путем оценки мембранотропной активности – методом биотестирования МГТБ.

Результаты и обсуждение. После осаждения белков сульфатом аммония из экстракта плодового тела гриба шиитаке были получены две фракции – супернатант и осадок, исследование которых показало, что мембранотропная активность [8] соответствует только фракции супернатанта.

С помощью SDS-электрофореза [9] было показано, что в экстракте гриба шиитаке (*lentinula edodes*) присутствуют вещества с мол. массой 15, 23, 50 и 75 кДа. В осадке экстракта присутствуют вещества с мол. массой 11, 14, 22, 45, 49, 78 кДа.

Определение концентрации белка в экстракте осуществляли спектрофотометрически [10]. Концентрация белков в экстракте составляет 1,56 мг/мл, в супернатанте 0,071 мг/мл, в осадке 2,77 мг/мл. Концентрацию углеводов определяли с помощью фенол-сернокислого метода [11]. В супернатанте экстракта плодового тела гриба шиитаке (*lentinula edodes*) концентрация углеводов составляет 120 мкг/мл. Размер частиц в супернатанте экстракта плодового тела гриба шиитаке составило 385±39 нм.

В настоящем исследовании, учитывая тканеспецифический, но не видоспецифический характер биологической активности МГТБ, использовали модель органотипического культивирования печени тритона (*pleurodeles waltl) in vitro.* В качестве параметра, отражающего биологическое действие МГТБ, была выбрана площадь, занимаемая пигментированными клетками печени тритона (*pleurodeles waltl)*, которую оценивали морфометрически [7]. Супернатант экстракта печени крысы был использован как препарат сравнения. Площадь, занимаемая пигментированными клетками в % от общей площади среза по отношению к контролю составила 142,0 ± 7,1 %, а площадь занимаемая пигментированными клетками в случае супернатанта экстракта плодового тела гриба шиитаке (*lentinula edodes*) составила 144,1 ± 7,2 % по отношению к контролю. Приведенные значения изучаемого параметра были статистически достоверными

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

по сравнению с контрольными (p<0,05). Таким образом можно предположить, что данные исследуемые фракции, выделенные из гриба шиитаке (*lentinula edodes*) проявляют гепатопротекторное свойство.

В рамках данной работы было показано присутствие в межклеточном пространстве плодового тела гриба шиитаке (*lentinula edodes*) МГТБ-подобных веществ. Были исследованы их некоторые физико-химические свойства, а также биологическая активность на модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* [7]. Согласно полученным результатам, супернатант экстракта гриба шиитаке (*lentinula edodes*) проявляет гепатопротекторное свойств, что согласуется с данными литературы [2]

Литература:

1. *Xiaofei Xu , Huidan Yan , Jian Tang , Jian Chen & Xuewu Zhang Polysaccharides in Lentinus edodes: Isolation, Structure, Immunomodulating Activity and Future Prospective // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2014. – №54. – P. 474–487.*
2. *Ayano Itoh, Katsuhiro Isoda, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Akihiro Watari,Masakazu Kobayashi, Makoto Tamesada and Kiyohito Yagi Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl4-Induced Liver Injury // Biol. Pharm. Bull. –2010. – №33(6). – P. 983–987 .*
3. *Bogdanov V.V., Fatculina E.F., Berezin B.B., Il'yna A.P., Yamskova, V.P., Yamskov I.A. Peptidosoderzhashaya frakciya iz kulturalnoy sredi Fusarium sambucinum: sostav i biologicheskoe deistvie // Prikladnaya biohimiya i mikrobiologia. – 2014. – V. 50. – № 2. – P. 177–183.*
4. *Yamskova, V.P., Krasnov M.S., Yamskov I.A. Novie experementalnie i teoreticheskie aspekti v bioregulyacii. Lambert academic publishing. – 2006. – P. 131–177.*
5. *Yamskova, V.P., Skripnikova V.S., Krasnov M.S., Yamskov I.A.// Biohimia. –2009. – V. 74. – № 9. – P. 1195–1203.*
6. *Maltsev D.I., Yamskova V.P., Il'yna A.P., Berezin B.B., Yamskov I.A. Bioreguliator iz pecheni kris // Prikladnaya biohimiya i mikrobiologia. – 2016. – 52 (3). – P. 1–4.*
7. *Borisenko, A.V., Yamskova, V.P., Krasnov, M.S et al . et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc. – 2007. – P. 35–46.*
8. *Yamskova V.P., Reznikova M.M. // Journal obshei biologii. – 1991. – V. 52. – №2. – P. 181–191.*
9. *Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V.227. – P. 680–685.*
10. *Doson R., Elliot D., Elliot U., Johns K Spravochnik biohimika. M.: Mir. – 1991. – P. 544.*
11. *Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Analyt. Chem. – 1956. – V. 28. – P. 350–356.*

.....

UDC 573.6.086.83

STUDY THE COMPOSITION, STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF SUPRAMOLECULAR STRUCTURES, ISOLATED FROM SHIITAKE MUSHROOMS (LENTINULA EDODES)

[1]Novikov V.I., [2]Maltsev D.I., [2]Yamskova, V.P., [1]Yamskov I.A.
[1]A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences (INEOS RAS), Moscow, Russia
[2]Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences IDB RAS, Moscow, Russia
e-mail: novikovwork93@gmail.com

In this work, shiitake mushroom fruit body (*lentinula edodes*) identified MGTB-like (membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators) substances, studied their biological activity in a model of roller organotypic culture and shows the membrane-activity characteristic of this group of bioregulators. It is shown that the studied substances in solutions exist in the nanostate, and are able to exert influence on the visco-elastic properties of the plasma membranes of mouse liver cells *in vitro*. And also stimulates the liver activity of macrophages newt *in vitro*.

Key words: bioregulator, shiitake mushroom, newt liver nanoparticles.

At present, special attention is given to substances of natural origin, and among them - derived from plants and mushrooms. For example, from mushrooms have been isolated polysaccharides (lentinan, geterogalaktan et al.) on which established effective drugs [1]. It is noted that mushroom extracts exhibit a wide spectrum of biological activities, including, show hepatoprotective action [2].

In this aspect, considerable interest is the new group of bioregulators - membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators (MGTB) that were detected previously in many mammalian tissues, plants as well as in the culture medium micromicelles *(fusarium s)* [3]. It should be noted that they are present in solution in the form of large

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

nanoscale particles (more than 100 nm) [4].

The aim of this work was the identification in the intercellular space MGTB-like fruiting body of higher mushroom shiitake *(lentinula edodes)* substances, the study of a number of physical and chemical properties and biological activity, which has been studied on the model of the roller organotypic culturing newt liver *in vitro* [7]. In the process of isolating and purifying MGTB-like substances, their presence in the fractions were determined by evaluating membranotropic activity - by biotesting MGTB.

Results and discussion

After protein precipitation with ammonium sulfate extract from shiitake mushroom fruit body two fractions were obtained - the supernatant and sediment survey which showed that the membrane-active [8] matches only the supernatant fraction.

Using SDS-electrophoresis [9] showed that the extract of shiitake mushroom *(lentinula edodes)* substance present mol. mass of 15, 23, 50 and 75 kDa. The sludge extract contains substances mol. weight of 11, 14, 22, 45, 49, 78 kDa.

Determination of protein concentration in the extract was performed spectrophotometrically [10]. The concentration of protein in the extract was 1.56 mg / ml in the supernatant of 0.071 mg / ml, 2.77 mg/ ml in the sediment. Carbohydrate concentration was determined by the phenol-sulfuric acid method [11]. The supernatant extract of shiitake mushroom fruiting body *(lentinula edodes)* carbohydrate concentration of 120 mcg / ml. The particle size in the supernatant of the extract of the fruiting body of the fungus Shiitake was 385 ± 39 nm.

In the present study, considering the tissue-specific, but not species-specific nature of the biological activity of MGTB used liver organotypic culture model of newt *(pleurodeles waltl) in vitro*. As a parameter that reflects the biological effects MGTB was selected area occupied by the liver pigmented cells of the newt *(pleurodeles waltl)*, which evaluated morphometric [7]. Rat liver extract supernatant was used as reference drug. The area occupied by the pigmented cells in% of the total area of the cut in relation to the control was 142,0 ± 7,1%, and the area occupied by the pigmented cells in the supernatant of the extract of the fruiting body of the fungus Shiitake *(lentinula edodes)* was 144,1 ± 7,2 % relative to control. The values of the studied parameters were statistically significant compared to controls ($p < 0,05$). Thus it can be assumed that the data studied fractions isolated from the mushroom shiitake *(lentinula edodes)* show hepatoprotective property.

As part of this work has been shown in the presence of the intercellular space of the fruiting body a mushroom shiitake *(lentinula edodes)* MGTB-like substances. Some of their physical and chemical properties and biological activity on the model of the roller organotypic culturing newt liver *in vitro* were investigated [7]. According to the results, the supernatant extract of shiitake mushroom *(lentinula edodes)* manifests hepatoprotective properties, which is consistent with the literature [2].

References:

1. *Xiaofei Xu , Huidan Yan , Jian Tang , Jian Chen & Xuewu Zhang Polysaccharides in Lentinus edodes: Isolation, Structure, Immunomodulating Activity and Future Prospective // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2014. – №54. – P. 474–487.*
2. *Ayano Itoh, Katsuhiro Isoda, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Akihiro Watari,Masakazu Kobayashi, Makoto Tamesada and Kiyohito Yagi Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl4-Induced Liver Injury // Biol. Pharm. Bull. –2010. – №33(6). – P. 983–987 .*
3. *Bogdanov V.V., Fatculina E.F., Berezin B.B., Il'yna A.P., Yamskova, V.P., Yamskov I.A. Peptidosoderzhashaya frakciya iz kulturalnoy sredi Fusarium sambucinum: sostav i biologicheskoe deistvie // Prikladnaya biohimiya i mikrobiologia. – 2014. – V. 50. – № 2. – P. 177–183.*
4. *Yamskova, V.P., Krasnov M.S., Yamskov I.A. Novie experementalnie i teoreticheskie aspekti v bioregulyacii. Lambert academic publishing. – 2006. – P. 131–177.*
5. *Yamskova, V.P., Skripnikova V.S., Krasnov M.S., Yamskov I.A.// Biohimia. –2009. – V. 74. – № 9. – P. 1195–1203.*
6. *Maltsev D.I., Yamskova V.P., Il'yna A.P., Berezin B.B., Yamskov I.A. Bioreguliator iz pecheni kris // Prikladnaya biohimiya i mikrobiologia. – 2016. – 52 (3). – P. 1–4.*
7. *Borisenko, A.V., Yamskova, V.P., Krasnov, M.S et al . et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc. – 2007. – P. 35–46.*
8. *Yamskova V.P., Reznikova M.M. // Journal obshei biologii. – 1991. – V. 52. – №2. – P. 181–191.*
9. *Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V.227. – P. 680–685.*
10. *Doson R., Elliot D., Elliot U., Johns K Spravochnik biohimika. M.: Mir. – 1991. – P. 544.*
11. *Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Analyt. Chem. – 1956. – V. 28. – P. 350–356.*

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

УДК 577.113.(7+4):547.327

НОВЫЕ АНАЛОГИ ДНК С N-(СУЛЬФОНИЛ)-ФОСФОРАМИДНЫМИ ГРУППАМИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АНТИСМЫСЛОВЫЕ АГЕНТЫ

Прохорова Д.В., Челобанов Б.П., Фокина А.А., Васильева С.В., Буракова Е.А., Стеценко Д.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8
e-mail: prohorova1994@gmail.com

Впервые получены новые аналоги ДНК, в которых все межнуклеотидные фосфатные группы замещены N-(сульфонил)-фосфорамидными группами. N-Мезилфосфорамидные олигодезоксинуклеотиды проявили перспективные свойства для дальнейшего изучения в качестве антисмысловых агентов.

Ключевые слова: антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды, твердофазный синтез, реакция Штаудингера, сульфонилазиды.

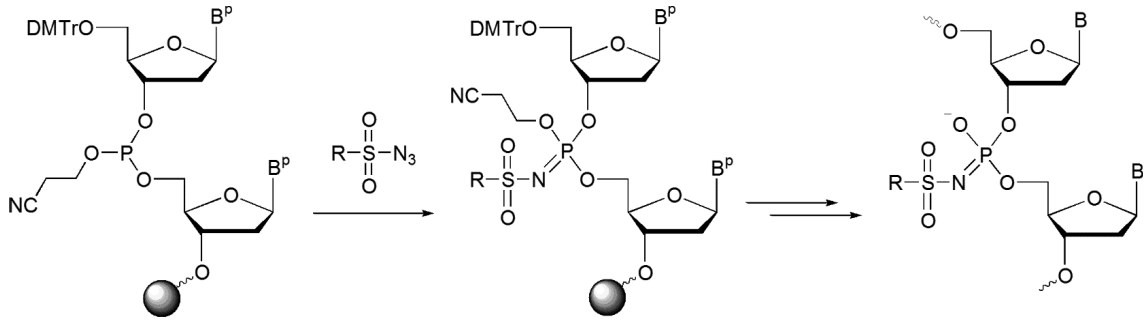


***Рис. 1**. Получение аналогов ДНК с межнуклеотидными N-(сульфонил)-фосфорамидными группами: R = **p**-C_6H_4Me (Tsp), Me (Msp).*

Производные ДНК с модифицированными фосфатными группами, в частности, ДНК-тиофосфаты, используются в химической биологии как нуклеазоустойчивые аналоги олигонуклеотидов и в медицине как антисмысловые терапевтические препараты. К данному классу соединений можно причислить производные ДНК, содержащие одну или небольшое число N-(сульфонил)-фосфорамидных групп, для которых показано образование устойчивого комплементарного комплекса с ДНК [1, 2]. Однако, их сродство к РНК не было исследовано, и замещенные по всем межнуклеотидным положениям N-(сульфонил)-фосфорамидные олигонуклеотиды (СФО) продолжали оставаться неизвестными.

Недавно в нашей лаборатории были впервые получены производные N-(сульфонил)-фосфорамидных олигодезоксинуклеотидов, в которых межнуклеотидные фосфатные группы замещены N-тозилфосфорамидными группами (Tsp) [3]. Данные соединения способны образовывать комплементарные комплексы как с ДНК, так и с РНК, обладающие устойчивостью, несколько уступающей устойчивости комплексов природных олигодезоксинуклеотидов. Синтез Tsp-олигонуклеотидов, как и других N-(сульфонил)-фосфорамидных производных, был осуществлен с помощью реакции Штаудингера между иммобилизованным на твердой фазе динуклеозид-2-цианэтилфосфитом и соответствующим сульфонилазидом (рис. 1). Были получены олигодезоксинуклеотиды, содержащие Tsp-группы во всех межнуклеотидных положениях. Однако, комплементарные комплексы с ДНК и РНК, образованные полностью замещенными олигонуклеотидами, оказались менее устойчивыми, чем у олигонуклеотидов с одной или двумя Tsp-группами.

Далее нами были впервые получены олигодезоксинуклеотиды, содержащие одну или несколько N-мезилфосфорамидных групп (Msp), в том числе и замещенные по всем межнуклеотидным положениям. Комплементарные комплексы, образуемые данными производными с ДНК или РНК, по своей устойчивости незначительно отличаются от комплексов, образуемых природными олигодезоксинуклеотидами. Это позволяет рассматривать новые аналоги ДНК, содержащие N-мезилфосфорамидные группы во всех межнуклеотидных положениях, как перспективную основу для создания антисмысловых терапевтических препаратов.

При финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 15-03-06331, 15-29-01334, 16-03-01055). Синтез моди-

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

фицированных олигонуклеотидов проводился за счет гранта РНФ № 15-15-00121.

Литература:
1. *Heindl D., Kessler D., Schube A., Thuer W., Giraut A. Easy method for the synthesis of labeled oligonucleotides // Nucleic Acids Symp. Ser. 2008. № 52. P. 405-406.*
2. *Канадский патент 2627208, 12.09.2006.*
3. *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. Химия. – 2017. – Т. 43. – № 1. – С. 45-50.*

UDC 577.113.(7+4):547.327

NEW DNA ANALOGUES CONTAINING N-(SULFONYL)-PHOSPHORAMIDATE GROUPS AS POTENTIAL ANTISENSE AGENTS

Prokhorova D. V., Chelobanov B. P., Fokina A. A., Vasilyeva S. V., Burakova E. A., Stetsenko D. A.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8
e-mail: prohorova1994@gmail.com

DNA analogues in which all phosphate groups have been replaced by N-(sulfonyl)-phosphoramidate groups have been obtained for the first time. N-Mesyl phosphoramidate oligodeoxynucleotides have shown promising properties as potential antisense agents.

Key words: antisense oligonucleotide, solid phase synthesis, Staudinger reaction, sulfonyl azide.

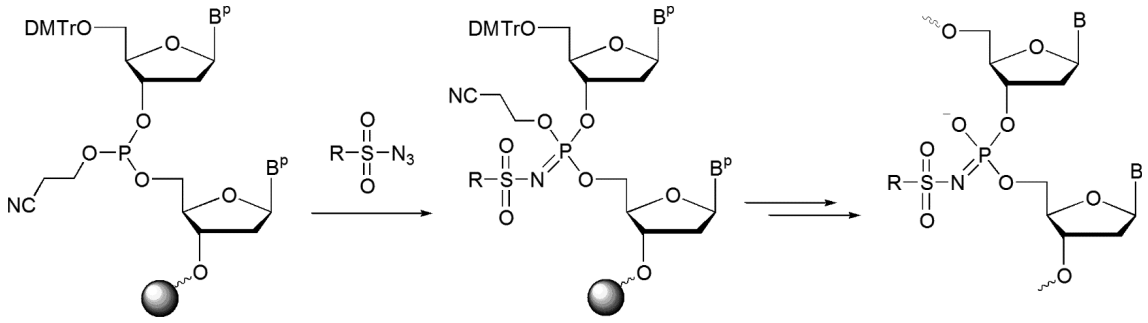


Fig. 1. *Synthesis of DNA analogues with internucleotide N-(sulfonyl)-phosphoramidate groups: R = **p**-C_6H_4Me (Tsp), Me (Msp).*

DNA derivatives with modified internucleotide phosphate groups such as DNA phosphorothioates are used in chemical biology as nuclease-resistant oligonucleotide analogues and in medicine as antisense therapeutics. In this type belong also oligonucleotides with one or small number of N-(sulfonyl)-phosphoramidate groups, which have been shown to form stable duplexes with DNA [1, 2]. However, their affinity to RNA has not been studied, and oligonucleotides fully substituted with N-(sulfonyl)-phosphoramidate groups remained unknown.

Recently in our laboratory new derivatives of N-(sulfonyl)-phosphoramidate oligodeoxynucleotides were obtained in which internucleotide phosphate groups have been replaced by N-tosyl phosphoramidate groups (Tsp) [3]. These compounds were capable of forming complementary complexes with DNA or RNA, the stability of which was somewhat inferior to the stability of such complexes of natural oligodeoxynucleotides. The synthesis of Tsp-oligonucleotides as well as other N-(sulfonyl)-phosphoramidate derivatives was carried out using Staudinger reaction between dinucleoside-2-cyanoethyl phosphite immobilized on solid phase and a corresponding sulfonyl azide (Fig. 1). Oligodeoxynucleotides containing Tsp-groups in all internucleotide positions have been also prepared. However, their complementary complexes with DNA and RNA proved to be less stable than those of oligonucleotides with one or two Tsp-groups.

Next, we synthesized for the first time oligodeoxynucleotides containing one or more N-mesyl phosphoramidate groups (Msp), including those substituted at all internucleotide positions. Complementary complexes formed by

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

those compounds with DNA or RNA have stability which is only slightly different from that of the complexes formed by natural oligodeoxynucleotides. This allows us to consider DNA analogues containing N-mesyl phosphoramidate groups in all internucleotide positions as a promising new type of antisense agents.

Authors acknowledge financial support from RFBR (grants №№ 15-03-06331, 15-04-04109, 15-29-01334, 16-03-01055). Syntheses of modified oligonucleotides were supported by RSF grant № 15-15-00121.

References:

1. *Heindl D., Kessler D., Schube A., Thuer W., Giraut A. Easy method for the synthesis of labeled oligonucleotides // Nucleic Acids Symp. Ser. 2008. № 52. P. 405-406.*
2. *Канадский патент 2627208, 12.09.2006.*
3. *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. – № 1. – P. 39-43.*

УДК 576.54

МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ И НОВЫЕ МЕТОДЫ ИХ ДЕТЕКЦИИ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ

Шипунова В. О., Деев С.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия
117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, дом 16/10
e-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu

Описана разработка нового высокочувствительного метода детекции наноструктур на поверхности клеток эукариот и мембраноассоциированных антигенов клеток. Продемонстрирован широкий спектр применимости данного метода: как для детекции количества нанокомплексов с трансформируемой архитектурой, так и для оценки уровня экспрессии поверхностных белков клеток.

Ключевые слова: адресная доставка, MPQ, MPQ-цитометрия, магнитные частицы, молекулярный биокомпьютинг, биосенсоры, раковые клетки.

Значительное внимание исследователей области нанобиотехнологии нацелено на изучение взаимодействия наноструктур с живыми клетками. Было разработано множество методов для количественной детекции взаимодействия нанообъектов с живыми клетками, однако данная задача всё также сопряжена с рядом трудностей как экспериментального, так и экономического характера. Для решения данной проблемы был разработан новый метод, названный MPQ-цитометрия [1], нацеленный на количественное исследование взаимодействий наночастиц с клетками эукариот. Данный метод использует магнитные маркёры как метки данных взаимодействий, которые детектируют оригинальной технологией MPQ (Magnetic Particle Quantification). Для детекции используется портативный регистратор, работающий при комнатной температуре. В отличие от традиционных полуколичественных методов, основанных на флуоресцентных метках, или методов микроскопии, MPQ-цитометрия даёт сведения об абсолютном содержании наночастиц в образце и не подвергается воздействию таких факторов, как фоновые сигналы или аутофлуоресценция клеток. Это свойство делает возможным детекцию даже в оптически непрозрачных средах, без дополнительной пробоподготовки. В отличие от ряда точных аналитических методов, MPQ-цитометрия не требует дорогостоящих оборудования и расходных материалов. Эффективность разработанного метода была продемонстрирована детекцией магнитных наночастиц с трансформируемой архитектурой, которые обладают биокомпьютерными способностями [2]. Было показано, что данные частицы способны выполнять булевы логические операции и связываться с поверхностью специфичных клеток на основании проведённого анализа молекулярного микроокружения как входного сигнала. Более того, метод MPQ-цитометрии был успешно использован для оценки эффективности адресной доставки наночастиц оксида железа, в том числе, селективно распознающих онкомаркёр HER2/neu и для детекции HER2/neu-положительных клеток в составе сложной смеси. Было показано, что данные, полученные методом MPQ-цитометрии, находятся в корреляции с данными, полученными тремя другими широко используемыми в

молекулярной и клеточной биологии методами и было показано, что при использовании с соответствующими нацеленными частицами, MPQ-цитометрия позволяет количественно оценивать уровень представленности поверхностных клеточных антигенов. Данный метод может стать надёжной альтернативой некоторым меточным методам, таким как проточная цитометрия и может быть широко использован для диагностики мембранных маркёров различных заболеваний, даже в полевых условиях.

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80105 «мол_эв_а» (модификация наночастиц, работа с клеточными культурами) и финансовой поддержке Российского Научного Фонда в рамках проекта №14-24-00106 (модификация белков, синтез наночастиц).

Литература:

1. *Shipunova V. O., Nikitin M. P., Nikitin P. I. and Deyev S. M. MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle–cell interactions// Nanoscale. 2016. Vol.* **8**. *№ 25. P. 12764-12772.*
2. *Nikitin M. P., Shipunova V. O., Nikitin P. I. and Deyev S. M. Biocomputing based on particle disassembly// Nat. Nanotech. 2014. Vol. 9. P. 716–722.*

УДК 576.54

MAGNETIC PARTICLE BASED MULTIFUNCTIONAL NANOSTRUCTURES AND NEW METHODS FOR THEIR DETECTION FOR THE CONTROLLED DELIVERY TO EUKARYOTIC CELLS

Shipunova V. O., Deyev S. M.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7, Miklukho-Maklaya St., 16/10
e-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu

The development of novel highly sensitive method, MPQ-cytometry, for the detection of “nanoparticle-cell” interactions and estimation of cell surface antigen expression is described. The capabilities of the proposed method were demonstrated by quantification of integral amount of different nanocomplexes with transformable architecture and by quantitative detection of expression level of different cell surface proteins.

Key words: targeted delivery, MPQ, MPQ-cytometry, magnetic particles, molecular biocomputing, biosensors, cancer cells.

Considerable attention of researchers in the field of nanobiotechnology is being directed toward investigating interactions of nanostructures with living cells. Numerous attempts were done to solve the problem of reliable quantitative analyses of interactions of nanoscale entities with cells, however, this task is still hampered by experimental and economic difficulties. To meet this challenge, a novel method called MPQ-cytometry [1] intended for quantitative investigation of interactions of nanoparticles with cells was developed. The method employs magnetic nanoparticles as labels of such interactions to be detected by an original technique of magnetic particle quantification (MPQ). The interactions are quantified by a portable device in real-time mode at room temperature. Unlike traditional semi-quantitative methods such as labeling fluorescent approaches or microscopy techniques, the MPQ-cytometry provides information about the absolute nanoparticle content in a cell sample and is not affected by any background signals such as cells’ autofluorescence. This feature allows quantifying the nanoparticle content even in opaque media such as whole blood or tissues without any additional sample preparation, which is extremely difficult to achieve with fluorescent techniques. As opposed to a number of precise analytical methods such as, for example, inductively coupled plasma mass spectrometry, this method is free from complicated sample preparation or time-consuming data processing, and does not require expensive equipment and consumables. The effectiveness of the proposed method was demonstrated by quantification of magnetic nanoparticles with transformable architecture possessing biocomputing capabilities [2] bound to cell surface. These particles were shown to implement logic gates and target specific cell surface based on logic-gated analysis of soluble biomolecular inputs. Moreover, MPQ-cytometry was successfully used for assessment of the effectiveness of targeted delivery of iron oxide nanoparticles that selectively bind to oncomarker HER2/neu and for detecting the HER2/neu positive cells in a mixture. The MPQ-cytometry data were shown to be in good correlation with those

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

obtained with three other methods commonly used in molecular and cellular biology: optical microscopy, flow cytometry and fluorescence spectroscopy. It was shown that when using these target-specific nanoparticles, the MPQ-cytometry is capable of quantifying the cell surface antigens. The MPQ-cytometry method could become more general and reliable alternative to some label-based methods such as flow cytometry and can be widely used for diagnostics of membrane-associated markers of various diseases even in field conditions.

The work was partially supported by Russian Foundation for Basic Research and by the National Intellectual Development Foundation (NIDF) according to the research project №17-34-80105 "mol_ev_a" (nanoparticle modification, cell culture) and by the Russian Science Foundation grant №14-24-00106 (protein modification, nanoparticle synthesis).

References:

1. *Shipunova V. O., Nikitin M. P., Nikitin P. I. and Deyev S. M. MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle–cell interactions// Nanoscale. 2016. Vol.* **8**. *№ 25. P. 12764-12772.*
2. *Nikitin M. P., Shipunova V. O., Nikitin P. I. and Deyev S. M. Biocomputing based on particle disassembly// Nat. Nanotech. 2014. Vol. 9. P. 716–722.*

.....

УДК 615.9 + 57.021

ПРОГНОЗ СПЕКТРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОЦИСТИНОВ

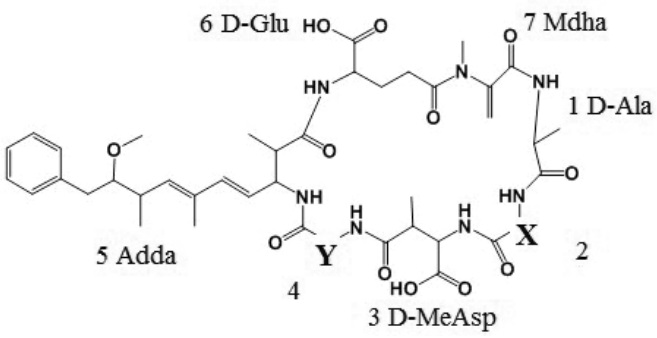
Чернова Е.Н., Русских Я.В., Мельникова Т.И., Федорова Е.В., Островский В.А.

ФГБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
196110, Санкт-Петербург, ул. Корпусная,18.
e-mail: s3561389@yandex.ru

Проведенный *in silico* анализ (PASS Refined 2014) показал, что потенциал цианобактериальных микроцистинов в качестве средств таргетной противоопухолевой терапии недостаточно высок, поскольку они способны к неспецифическому взаимодействию с рядом регуляторных молекул белковой и пептидной природы.

Ключевые слова: микроцистины; прогноз биологической активности; PASS; антинеопластическое действие; цитотоксичность.

В настоящее время в природных водоемах наблюдается увеличение темпов роста (цветения) токсических видов цианобактерий. Одним из классов метабо-литов являются цианобактерий гепатотоксичные микроцистины (МС). Общая структура МС содержит цикл из семи аминокислот, пять из которых постоянны, включая характеристическую Adda (3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота), а две L-аминокислоты в положениях 2 (X) и 4 (Y) – вариабельны. Известно более 80 структур МС (WHO, 2011).



МС водорастворимы, но при этом способны проникать через липидные мембраны, что обусловливает их биологическую активность, в том числе токсические эффекты. Известно, что МС обладают цитотоксическим действием, что привлекает внимание разработчиков противоопухолевых средств. Наиболее изученный механизм токсического действия МС – ингибирование протеинфосфатаз типа 1 и 2A (Sainis et al., 2010).

Однако токсикологический профиль МС не ограничивается воздействием на протеинфосфатазы. В настоящем исследовании представлены результаты компьютерного прогнозирования спектра биологической активности и связанных с ней механизмами действия 20 наиболее часто встречаемых МС с использованием программного обеспечения PASS Refined 2014 (Prediction of Activity Spectra for Substances). Порог вероятности проявления предсказанной активности был выбран Pa>0,1 при сохранении условия Pa>Pi.

По результатам выполненного прогноза для всех исследованных МС обнаружено 64 возможных биоло-

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

гических эффектов и 149 механизмов действия. Антинеопластический эффект прогнозируется у всех структурных вариантов с вероятностью 64-83%. Наиболее часто прогнозируемым механизмом являлось ингибирование ряда регулирующих жизненно важные реакции внутриклеточных ферментов (протеинтирозинкиназа, урокиназа), в том числе протеасом, что обеспечивает антинеопластический эффект. Кроме того, прогнозируется инги-бирование системы комплемента (влияние на протекание иммунных процессов в организме) и тканевого калликреина (нарушение процессов адаптации и защиты), антагонистическое действие к рецепторам фибриногена (приводящее к нарушению свертывания крови и управления воспалительными процессами).

Проведенный in silico анализ показывает, что потенциал микроцистинов в качестве средств таргетной противоопухолевой терапии недостаточно высок, поскольку они способны к неспецифическому взаимодействию с рядом регуляторных молекул. Так, PASS указывает, что микроцистины обладают свойствами агонистов к ряду пептидов (Atrial natriuretic peptide agonist; Peptide agonist; Follicle-stimulating hormone agonist) с вероятностью 27-46%. Прогнозирование терапевтической активности МС с вероятностью 33% при септическом шоке, опосредуемом белковыми молекулами «цитокинового шторма» косвенно подтверждает этот вывод.

Таким образом, МС проявляют плейотропные биологические свойства, реализующиеся через взаимодействия с различными мишенями в организме. Результаты прогнозирования указывают на вероятный спектр биологических эффектов МС и позволяют приблизиться к пониманию токсикологического профиля соединений.

Литература:
1. *WHO. Guidelines for Drinking Water Quality. 4th ed:World Health Organization. 2011. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en*
2. *Sainis I., Fokas D., Vareli K., Tzakos A.G., Kounnis V., Briasoulis E. Cyanobacterial Cyclopeptides as Lead Compounds to Novel Targeted Cancer Drugs (Review) // Mar. Drugs. - 2010. - V. 8. - P. 629-657.*

UDC 615.9 + 57.021

THE PREDICTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY SPECTRA FOR MICROCYSTINS

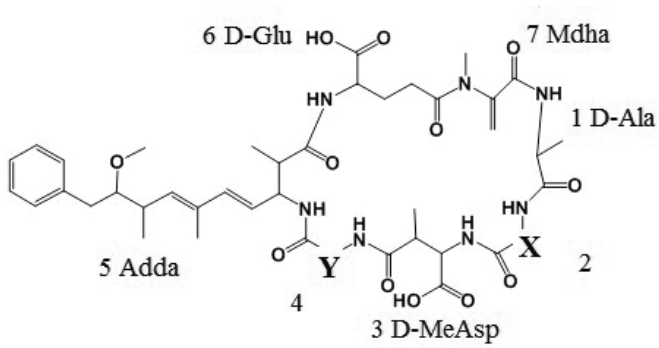
Chernova E.N., Russkikh Ia.V., Melnikova T.I., Fedorova E.V., Ostrovskii V.A.

Scientific Research Centre for Ecological Safety of Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia
Korpusnaya ul., 18, Saint Petersburg, 196110, Russia.
e-mail: s3561389@yandex.ru

In silico studies of cyanobacterial microcystins (MC) using the program PASS Refined 2014 showed that the potential of MC as a means of targeted tumor therapy is insufficient, because they are capable of non-specific interaction with a number of regulatory molecules of protein and peptide nature.

Key words: microcystins; prediction of biological activity; PASS; antineoplastic effects; cytotoxicity.

Abundant growth of toxic species of cyanobacteria in water reservoirs is a common experience in polluted inland water systems all over the world. The most widespread cyanobacterial metabolites are hepatotoxic microcystins (MC). MC structure is a cycle of seven amino acids, five of which are permanent, including characteristic acid Adda (3-amino-9-methoxy-2,6,8,-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid). Structural variants - of which some 80 have been reported - differ in amino acids in position 2 (X) and 4 (Y) (WHO, 2011).



MCs are water soluble, but able to penetrate the lipid membranes, that determines the biological activity of these compounds, including toxic effects. It has been known that MCs show a cytotoxic effect that attracts the attention of the developers of anticancer agents. The most studied mechanism of MCs toxicity is inhibition of protein phosphatase type 1 and 2A (Sainis et al., 2010).

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

However, the toxicological profile of MCs is not limited to the impact on protein phosphatase. This study presents the results of computer prediction of the spectrum of biological activity and related mechanisms of action of twenty most frequently detected MCs using PASS Refined 2014 software (Prediction of Activity Spectra for Substances). The threshold of the probability of the predicted activity was chosen Pa> 0.1 while maintaining the condition Pa> Pi.

As results of the forecast for all investigated MC 64 possible biological effects and 149 mechanisms of action were predicted. The antineoplastic effect was predicted for all structural variants with probability 64-83%. Most frequently predicted mechanism was the inhibition of regulating vital intracellular enzymes (protein tyrosine kinase, urokinase), including proteasomes, which provides anti-neoplastic effect. As well according to the obtained biological activity spectrum, it is likely, that MCs may act as complement inhibition (influence on immune system), tissue kallikrein inhibitor (disturbance of adaptation and protection processes), fibrinogen receptors antagonist (leading to disruption of the blood and coagulation control inflammatory processes).

In silico studies of MCs using the program PASS Refined 2014 showed that the potential of MC as a means of targeted tumor therapy is insufficient, because they are capable of non-specific interaction with a number of regulatory molecules of protein and peptide nature. On the basis of predicted biological activity spectra it was shown that microcystins may act as some peptides agonist (Atrial natriuretic peptide agonist; Peptide agonist; Follicle-stimulating hormone agonist) with a probability of 27-46%. Predicted MC therapeutic activity in septic shock with a probability of 33%, mediated by protein molecules “cytokine storm” indirectly confirms this conclusion.

Thus, pleiotropic biological properties of MCs realizing through the interaction with different targets in the body were predicted. The obtained likely biological effects spectrum for MCs allows to come closer to understanding of the toxicological profile of the studied compounds.

References:

1. WHO. Guidelines for Drinking Water Quality. 4th ed:World Health Organization. 2011. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/

2. Sainis I., Fokas D., Vareli K., Tzakos A.G., Kounnis V. and Briasoulis E. Cyanobacterial Cyclopeptides as Lead Compounds to Novel Targeted Cancer Drugs (Review) // Mar. Drugs. - 2010. - V. 8. - P. 629-657.

.....

УДК 6.60.606

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ ПОЛОКСАМЕР-ГИАЛУРОНАТ-ЭНДО-Β-N-АЦЕТИЛГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ

Ермолаева Л.А., Фомина Т.И., Федорова Е.П., Неупокоева О.В., Чурин А.А., Скурихин Е.Г., Мадонов П.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия
634028, г. Томск, пр. Ленина 3
e-mail: ermolaeva_la@mail.ru

Проведено изучение безопасности ФС на основе полаксамер-гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы на мышах и крысах. Показано, что тестируемый препарат при энтеральном и парентеральных путях введения не оказывает какого-либо токсического действия на функциональное состояние органов и систем организма экспериментальных животных.

Ключевые слова: фармацевтическая субстанция на основе полаксамер-гиалуронат-эндо-β-n-ацетилгексозаминидазы, острая токсичность, мыши, крысы.

Частая встречаемость и позднее диагностирование интерстициальных заболеваний легких обусловливает важную роль данной патологии в инвалидизации и увеличении смертности пациентов пульмонологического профиля. Необходимой задачей в современной пульмонологии является разработка новых препаратов для лечения и профилактики хронических неспецифических заболеваний легких.

Цель работы: доклиническое изучение острой токсичности фармацевтической субстанции на основе полаксамер-гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы при однократном введении мышам и крысам

Было проведено изучение острой токсичности фармацевтической субстанции на основе полаксамер-гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы (ФС). Тестируемый препарат получен путем электрон-

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

но-лучевого синтеза гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы с молекулой полиэтиленоксида 1500 Исследование выполнено на 130 крысах, 130 мышах. Мыши и крысы конвенциональные, 1-й категории (сертификат здоровья лабораторных животных, выдан НЦБМТ РАМН). Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012) [2] Животным внутрижелудочно, внутрибрюшинно, интраназально и интратрахеально (согласно предполагаемому парентеральному пути применения в клинике) вводили ФС. Были использованы дозы в диапазоне 90-800 МЕ/кг.

Изучение острой токсичности проведено для определения переносимых, токсических и летальных доз тестируемого средства при внутрижелудочном, внутрибрюшинном интраназальном и интратрахеальном введении мышам и крысам, установления причин наступления гибели животных в течение 14 дней наблюдения, изучения влияния его на общее состояние, некоторые функциональные и морфологические показатели [1, 3].

В результате эксперимента по исследованию острой токсичности показано, что введение ФС в дозах, 90-800 МЕ/кг не оказывает токсического действия на организм животных при наблюдении за ними в течение 14 дней, не приводит к их гибели. Введение ФС крысам и мышам в максимально допустимом для введения объеме не позволило достигнуть дозы, вызывающей гибель животных, и, следовательно, применить пробит-анализ для вычисления ЛД50. Наблюдение за животными в течение 14 дней не выявило никаких изменений внешнего вида, аппетита, поведения и двигательной активности мышей. Масса мышей и крыс и процент прироста массы во всех экспериментальных группах не отличалась от контроля. При взвешивании на 8 и 15 день отмечено, что все животные равномерно прибавили в массе. Макроскопическое исследование при вскрытии всех выживших животных на 14 сутки после введения не выявило какой-либо патологии внутренних органов.

Таким образом, проведенное экспериментальное исследование острой токсичности ФС показало, что тестируемый препарат при однократном энтеральном и парентеральных путях введения мышам и крысам не оказывает какого-либо токсического действия на функциональное состояние органов и систем организма экспериментальных животных.

Литература:
1. *Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта - Л., 1968. – 151с.*
2. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под общей редакцией Миронова А.Н. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.*
3. *Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные: Разведение, содержание, использование в эксперименте - Киев: Вища шк., 1983. - 383 с.*

УДК 6.60.606

A STUDY OF THE TOXIC PROPERTIES OF THE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE BASED ON THE POLOXAMER-HYALURONATE-ENDO-B-N-ATSETILGEKSOZAMINIDAZY

Ermolaeva L.A., Fomina T.I., Fedorova E.P., Neupokoeva O.V., Churin A.A., Skurihin E.G., Madonov P.G.

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia
634028, Tomsk, Lenina st. 3
e-mail: ermolaeva_la@mail.ru

Abstract: Drug safety study of the pharmaceutical substance of polaksamer-hyaluronate-endo-β-N-atsetilgeksozaminidazy (FS) was performed. It was shown that the testing preparation after a single enteral and parenteral methods of injection do not appear to have any toxic effect on the functional state of body systems and organs of experimental animals.

Key words: the pharmaceutical substance of polaksamer-hyaluronate-endo-β-N-atsetilgeksozaminidazy, acute toxicity, mice, rats.

Frequent occurrence and late diagnosis of interstitial lung disease determines an important role of these diseases in increasing disability and mortality of pulmonary patients. The development of new drugs for the

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

treatment and prevention of chronic non-specific lung diseases is a necessary purpose of modern pulmonology.

Purpose of the study: preclinical studies of acute toxicity of the pharmaceutical substance based on polaksamer-hyaluronate-endo-β-N-atsetilgeksozaminidazy after a single injection to mice and rats.

Acute toxicity study of the pharmaceutical substance of polaksamer-hyaluronate-endo-β-N-atsetilgeksozaminidazy (FS) was performed. Test preparation was obtained by electron-beam synthesis of fusion-hyaluronate endo-β-N-atsetilgeksozaminidazy with molecule of polyethylene oxide 1500. Study carried out with 130 rats and 130 mice. Mice and rats are conventional, 1st category (certified laboratory Animal Health, issued SCBMT RAMS). The animals were kept according to the rules adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals (Strasbourg, 1986), according to the "Guidelines for conducting pre-clinical studies of drugs" (Moscow, 2012) [2]. The FS was injected to the animals intragastric, intraperitoneally, intranasally and intratracheally (according to the intended parenteral application in the clinic). Doses were used in the range of 90-800 IU/kg.

The study of acute toxicity was performed to determine the tolerable, toxic and lethal doses of the test agent in intragastric, intraperitoneal intranasal and intratracheal injection to mice and rats, for determination the causes of death of the animals within 14 days of observation, study its influence on the general state, some of the functional and morphological indices [1, 3].

As a result of experiment on the acute toxicity study is demonstrated that injecting FS at doses 90-800 IU/kg is not toxic to the animal organism which observing for 14 days and did not leads to their death. Injection of FS to mice and rats at the maximum allowable amount is not allowed to reach the dose causing the death of animals, and, therefore, use probit analysis for calculating LD50.

Observation of the animals for 14 days did not reveal any changes in appearance of appetite, behavior and motor activity of mice and rats. The weight of mice and rats and the percentage of mass increase in all experimental groups did not differ from control parameters. All animals gained weight evenly, which was found at the weigh-in on the 8th and 15th days. During the autopsy of surviving animals (on day 14 after the injection of FS), the macroscopic study did not reveal any pathology of internal organs.

Thus, experimental studies of acute toxicity FS showed that the test preparation after a single enteral and parenteral methods of injection to mice and rats do not appear to have any toxic effect to the functional state of organs and body systems of experimental animals.

References:
1. *Belenkiy M.L. Elements of quantitative assessment of pharmacological effect - L., 1968. – 151 p.*
2. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennykh sredstv (A Guide to Preclinical Testing of Medicines), Mironov, A.N., Ed., Moscow: Grif i K, 2012, part 2. – 944 p.*
3. *Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zacharias E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratory animals: Breeding, keeping, use in the experiment - Kiev:Visshaya shkola, 1983. -383 p.*

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ - РАЗРАБОТКА И КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Тикунова Н.В., Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Ганичев Д.А., Власов В.В.

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия; 630090, пр-т Лаврентьева 8, Новосибирск,
e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Лекарственно устойчивые бактерии в настоящее время стали глобальной угрозой. Перспективным подходом к решению проблемы является применение бактериофагов - вирусов, вызывающих гибель бактерий, но не способных заразить человека. Бактериофаги не вызывают побочных эффектов и не токсичны. В отличие от антибиотиков бактериофаги как правило поражают конкретный вид и штамм бактерий и поэтому не нарушают нормальную микрофлору. В Российской Федерации производятся фармацевтические препараты на основе бактериофагов и их коктейлей, однако большинство таких препаратов были разработаны в прошлом веке, и в настоящее время их характеристики не удовлетворяют современным требованиям. Кроме того, основным условием применения терапевтического бактериофага должно стать наличие чувствительности к нему инфекционного агента. Это предполагает проведение быстрого и качественного микробиологического анализа, оперативный выбор фагового препарата или коктейля и микробиологический контроль терапии. В ИХБФМ СО РАН разработана и опробована методика персонализированного применения препаратов бактериофагов. Выделены и охарактеризованы уникальные бактериофаги, эффективные против широкого спектра бактерий, включая антибиотикорезистентные бактерии. Из охарактеризованных бактериофагов составлены фаговые коктейли, в том числе уникальный полиспецифический

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

коктейль, содержащий бактериофаги против 11 видов патогенных бактерий, включая недавно распространившихся возбудителей нозокомиальных инфекций. Накоплен клинический опыт персонализированного применения препаратов бактериофагов в лечении гнойно-септических язв при синдроме диабетической стопы, инфекций послеоперационных ран. Использование фаготерапии в клинике обеспечило излечение большинства пациентов, заболевания которых были вызваны резистентными бактериями, и антибиотикотерапия была безуспешной.

THERAPEUTIC PREPARATIONS ON THE BASE OF BACTERIOPHAGES – DEVELOPMENT AND CLINICAL APPLICATION

Tikunova N.V., Morozova V.V., Kozlova Yu .N., Ganichev D.A., Vlassov V.V.

Institute of chemical biology and fundamental medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;
630090, Lavrent'ev av. 8, Novosibirsk,
e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Antibiotic-resistant bacteria become a global threat now. A promising approach to solving the problem is the use of bacteriophages - viruses that can destruct bacteria, but not able to infect humans. Bacteriophages do not cause side effects and are not toxic. Unlike antibiotics, bacteriophages are mostly species- and strain-specific and therefore do not disrupt the normal human microbiome. In Russia, there are approved phage preparations and cocktails, but most of them were developed in the last century and their characteristics do not meet recent requirements. In addition, the main criterion for the application of therapeutic bacteriophage should be sensitivity of bacterial agent to the bacteriophage. This requires a fast and qualitative microbiological analysis, rapid selection of the appropriate therapeutic phage or a cocktail, and microbiological control of treatment. In ICBFM SB RAS, the approach to personalized implementation of phage therapy was developed and tested. A number of original and unique bacteriophages that are effective against a broad spectrum of bacteria were isolated and characterized. Several new phage cocktails, including unique polyspecific cocktail containing bacteriophages against 11 species of pathogenic and nosocomial bacteria were elaborated. Clinical data on personalized application of phage preparations for the treatment of diabetic foot ulcers and infections of surgical wounds experience were accumulated and analyzed. The use of phage therapy in the clinic provided the healing of most patients, whose diseases were caused by resistant bacteria and previous antibiotic therapy was unsuccessful.

УДК 616-092.18

ПРОЯВЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С РАЗЛИЧНЫМ ПОВЕРХНОСТНЫМ ЗАРЯДОМ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Каба С.И., Соколовская А.А., Егорова Е.М.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия
125315, Москва, ул. Балтийская, 8
E-mail: said.kaba@gmail.com

Методом биохимического синтеза получены наночастицы серебра с различной плотностью поверхностного заряда. На клеточных линиях EA.hy926 и Jurkat определено влияние поверхностного заряда наночастиц на основные токсические эффекты в клеточной культуре.

Ключевые слова: наночастицы серебра; поверхностный заряд; цитотоксичность.

Введение. Использование наночастиц серебра (НЧС) в медицине является актуальной областью исследований, так как наносеребро обладает выраженными биоцидными свойствами. Вместе с тем остаётся значимой проблема биосовместимости НЧС. Взаимодействие с клетками организма зависит от собственных параметров наночастиц; наименее изученным является их поверхностный заряд. Целью нашего исследования была оценка влияния поверхностного заряда НЧС на жизнедеятельность клеток.

Методы. НЧС в водном растворе получали методом биохимического синтеза с применением кверцетина в качестве восстановителя и аэрозоля-ОТ (АОТ) или бета-циклодекстрина (β-ЦД) в качестве стабилизатора [1]. Подбирая условия синтеза, готовили наночастицы сферической формы и одинакового среднего размера,

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

но с разным дзета-потенциалом. Размеры наночастиц определяли методом просвечивающей электронной микроскопии. Культуры эндотелиоцитов (линия EA.hy926) и Т-лимфобластов (линия Jurkat) инкубировали с НЧС в диапазоне их концентраций 0,5 – 2,5 мкг/мл в течение 24 ч в стандартизированных условиях. После инкубации определяли жизнеспособность клеток в тесте МТТ, морфологические изменения в культуре, а также уровень апоптоза и некроза с помощью аннексина V и пропидий иодида [2, 3]. Все эксперименты выполняли в трёх независимых повторах. Статистические различия определяли, используя *t*-тест Стьюдента.

Результаты. НЧС, стабилизированные АОТ (НЧС-АОТ), имели размер (13,2±4,72) нм и дзета-потенциал (–89,42±4,32) мВ; для НЧС, стабилизированных β-ЦД (НЧС-β-ЦД), эти значения составляли, соответственно, (13,3±7,97) нм и (–35,93±2,52) мВ. НЧС-АОТ вызывали заметное дозозависимое снижение жизнеспособности: в клетках EA.hy926 это снижение начиналось при концентрации наночастиц 1,5 мкг/мл, а в Jurkat – при 2,0 мкг/мл. Также НЧС-АОТ вызывали заметное повышение уровня апоптоза и некроза в обеих клеточных линиях, начиная с концентрации 2,0 мкг/мл. Эти же НЧС вызывали изменения форм клеток, а в случае с клетками EA.hy926 – также отсоединение от субстрата. Напротив, НЧС-β-ЦД не вызывали никаких цитотоксических изменений во всём диапазоне концентраций. Отсутствие цитотоксичности этих наночастиц по МТТ-тесту сохранялось и при добавлении в их раствор водного раствора АОТ; отсюда следует, что цитотоксичность наночастиц, стабилизированных АОТ, обусловлена действием именно наночастиц, но не присутствующими в растворе молекулами стабилизатора.

Выводы. Наночастицы серебра одинаковой формы и среднего размера, но различавшиеся значениями дзета-потенциала вследствие применения разных стабилизаторов, обладали различной цитотоксичностью по отношению к клеткам Jurkat. Наночастицы с большим отрицательным поверхностным зарядом обладали заметной токсичностью, тогда как для менее заряженных наночастиц токсическое действие не обнаруживалось. Полученные результаты позволяют говорить о влиянии поверхностного заряда на взаимодействие наночастиц серебра с клетками и его роли в развитии патологических эффектов на клеточном уровне.

Литература:
1. *Егорова Е.М., Кубатиев А.А., Швец В.И. Биологические эффекты наночастиц металлов. М.: Наука, 2014. 350 с.*
2. *Egorova E.M., Kaba S.I., Tlupova S.A. Assessment of the cytotoxicity of silver nanoparticles with different surface charge. // Advances in Nanotechnology. 2016. Vol. 15. P. 25-48.*
3. *Каба С. И., Соколовская А. А., Тлупова З. А., Егорова Е. М. Цитотоксическое действие наночастиц серебра с различным поверхностным зарядом по отношению к клеткам линии Jurkat. // Патогенез. – 2016. – №3. – С. 31-37.*

.....

UDC 616-092.18

MANIFESTATION OF IN VITRO TOXICITY OF SILVER NANOPARTICLES WITH DIFFERENT SURFACE CHARGE

Kaba S.I., Sokolovskaya A.A., Egorova E.M.

The Institute of General pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia
Baltiyskaya st., 8, 125315, Moscow
E-mail: said.kaba@gmail.com

Silver nanoparticles with different surface charge density were obtained by using biochemical synthesis method. The influence of nanoparticle surface charge on general cytotoxic effects was studied on EA.hy926 and Jurkat cell lines.

Key words: silver nanoparticles; surface charge; cytotoxicity.

Introduction. The use of silver nanoparticles (SNP) in medicine is a growing field of research, as nanosilver possesses significant biocide properties. At the same time, biocompatibility of SNP represents an important problem. Interaction of nanoparticles with mammalian cells depends on nanoparticle parameters, the least studied is particle surface charge. The aim of our study is to estimate the effect of SNP surface charge on cell vital activity.

Methods. SNP in aqueous solution were obtained via biochemical synthesis method using quercetin as a reducing agent and aerosol-OT (AOT) or β-cyclodextrin (β-CD) as stabilizers [1]. By choosing optimal synthesis conditions, spherical nanoparticles with the same mean size but different zeta potentials were prepared. Nanoparticle size was determined by transmission electron microscopy. Endothelial (EA.hy926) and T-lymphoblast (Jurkat) cells were incubated for 24 h with SNP in the concentration range of 0.5 – 2.5 μg/mL in standard conditions. After incubation, cell viability via MTT assay, apoptotic and necrotic levels using annexin V and propidium iodide, and

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

morphological changes in cell culture were evaluated [2, 3]. All experiments were performed in three independent tests. Statistical differences were determined using Student's *t*-test.

Results. The size and zeta potential of AOT-stabilized SNP (AOT-SNP) was 13.2 ± 4.72 nm and −89.42±4.32 mV, respectively; the correspondent values for β-CD-stabilized SNP (β-CD-SNP), were 13.3±7.97 nm and −35.93±2.52 mV. AOT-SNP caused significant dose-dependent decrease of cell viability beginning from the concentration of 1.5 μg/mL in EA.hy926 and 2.0 μg/mL in Jurkat cells. In addition, AOT-SNP provoked the significant increase of apoptosis and necrosis levels beginning from 2.0 μg/mL in both cell lines. Also, these SNP altered cell shape and, in the case of EA.hy926, they induced cell detachment. By contrast, β-CD-SNP caused no cytotoxic changes in the whole concentration range studied. For β-CD-SNP the cytotoxic effects were absent in MTT assay also after AOT aqueous solution was added to the SNP solution. Hence follows that cytotoxicity caused by AOT-stabilized nanoparticles is conditioned by the nanoparticles themselves, but not by the stabilizer molecules present in solution.

Conclusions. Silver nanoparticles of the same average size and shape, but with different zeta potential values as a consequence of different stabilizers, manifested different cytotoxic behavior towards Jurkat cells. The nanoparticles with a higher value of negative surface charge were toxic whereas for the less charged nanoparticles no toxic effects were detected. The results obtained suggest an impact of nanoparticle surface charge on interaction of silver nanoparticles with cells and its role in the development of pathological effects at the cellular level.

References

1. *Egorova E.M., Kubatiev A.A., Shvets V.I. Biological effects of metal nanoparticles. Moscow: Nauka. 2014. 350 pp.*
2. *Egorova E.M., Kaba S.I., Tlupova S.A. Assessment of the cytotoxicity of silver nanoparticles with different surface charge. // Advances in Nanotechnology. 2016. Vol. 15. P. 25-48.*
3. *Kaba S.I., Sokolovskaya A.A., Tlupova Z.A., Egorova E.M. The cytotoxic effects of silver nanoparticles with different surface charge in Jurkat cells. // Patogenez. – 2016. – V. 14. – No.3. – P. 31-37.*

УДК 57.088.3

МЕТОД ОЧИСТКИ ВЫРЕЗАННЫХ ИЗ ПЛАЗМИДЫ ФРАГМЕНТОВ ДНК ОТ ВЕКТОРА В ГОМОГЕННОМ ФОРМАТЕ БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Шепелев М. В., Калиниченко С. В., Коробко И. В.

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

Разработан новый метод отделения от векторных последовательностей фрагмента ДНК, вырезанного из плазмиды эндонуклеазами рестрикции, основанный на специфическом истощении молекул вектора из раствора, и не требующий разделения молекул ДНК в агарозном геле.

Ключевые слова: рекомбиназа Cre; рестрикция плазмидной ДНК; выделение фрагментов ДНК; гомогенный формат.

Выделение и очистка фрагментов ДНК после расщепления плазмидной ДНК эндонуклеазами рестрикции является рутинной процедурой генной инженерии. Для разделения фрагментов ДНК обычно используется электрофорез в агарозном геле. Нами был разработан новый метод выделения фрагмента ДНК, вырезанного из плазмиды, который не требует использования электрофореза или наличия специфических нуклеотидных последовательностей в целевом фрагменте ДНК. Метод основан на принципе негативной селекции и состоит в удалении из раствора молекул вектора, имеющих в своем составе сайты LoxP, путем их сорбции на иммобилизованной на твердофазном носителе рекомбиназе Cre, дефектной по рекомбиназной активности. Данный метод может быть особенно полезен при очистке фрагментов ДНК, используемых для получения трансгенных животных, так как наличие в препарате ДНК следов агарозы может привести к гибели эмбрионов после микроинъекции, а также при выделении больших фрагментов ДНК, которые могут быть механически повреждены при применении стандартных аффинных методов очистки ДНК из агарозного геля. Кроме того, метод позволяет разделять фрагменты ДНК сходной длины, что невозможно при использовании электрофореза в агарозном геле. Исследование выполнено за счет гранта Российкого научного фонда (проект №16-14-00150).

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

UDC 57.088.3

A GEL-LESS ISOLATION OF UNTAGGED PLASMID DNA INSERT FROM VECTOR BACKBONE AFTER DIGESTION IN HOMOGENEOUS FORMAT

Shepelev M.V., Kalinichenko S.V., Korobko I.V.

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

A novel method for separation of plasmid DNA fragment from a vector backbone after restriction endonuclease digestion is developed. The method is based on specific depletion of vector molecules from solution and does not require agarose gel electrophoresis.

Key words: Cre recombinase; plasmid DNA digestion; DNA fragment isolation; homogeneous format.

DNA fragment isolation and purification after plasmid DNA digestion is a routine procedure in genetic engineering, and agarose gel electrophoresis with subsequent DNA fragment extraction from gel is a standard approach. Here, we describe a method for DNA fragment isolation after plasmid DNA digestion that requires neither gel separation nor presence of specific sequences in the insert fragment. The method is based on a negative selection through depletion of a vector backbone bearing LoxP sites from solution by sorption on solid phase immobilized Cre recombinase protein deficient in recombinase activity. The method might be especially useful for purification of DNA fragments for generation of transgenic animals since residual agarose is able to induce lethality of embryos upon microinjection, and for purification of large DNA fragments which might be subjected to mechanical damage during purification with conventional affinity-based gel extraction methods. In addition, the method enables separation of DNA fragments of similar size that is not possible when using gel electrophoresis. The work was performed with the support from Russian Science Foundation, grant No. 16-14-00150.

.....

УДК – 612.616:616.69

ПОИСК НОВЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

Скурихин Е.Г., Пахомова А.В., Першина О.В., Ермакова Н.Н., Крупин В.А., Пан Э.С., Ермолаева Л.А., Кудряшова А.И., Дыгай А.М.

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия. 634028, Томск, пр. Ленина, 3
e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com

Выявлены мишени-стволовые / прогениторные клетки для лекарственной терапии нарушений сперматогенеза.

Ключевые слова: стволовые клетки, сперматогенез, регенерация семенников

Бесплодный брак является одной из важнейших социальных и медицинских проблем. Причины мужского бесплодия многообразны. Терапия гипогонадизма базируется на восполнении дефицита гормона тестостерона. Альтернативой гормонотерапии может стать такой подход стимуляции регенерации тестикулярной ткани как фармакологическая регуляция тканеспецифичных стволовых клеток.

Целью исследования явился поиск потенциальных мишеней-стволовых / прогениторных клеток для лекарственной терапии нарушений сперматогенеза различной этиологии.

Эксперименты выполнены на мышах линий C57BL/6. Нарушения сперматогенеза вызывали ишемией семенников, жировой диетой, диабетом 2 типа, диабетом 1 типа, цитостатиком бусульфаном. Материалом для исследования выступали сыворотка крови, поджелудочная железа, семенники. Использовались функциональные, морфологические, иммуногистохимические и цитометрические методы исследования, иммуноферментный анализ, методы культуры клеток, трансплантационный тест.

В условиях целостного организма и in vitro охарактеризованы различные популяции сперматогони-

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

альных стволовых клеток, эндотелиальных и эпителиальных прогениторных клеток, предшественники гемангиогенеза, предшественники стромальной ткани мочеполовой системы, мезенхимальные стволовые клетки. Для каждой модели нарушения сперматогенеза выявлены потенциальные мишени-стволовые / прогениторные клетки. Проведена апробация эффективности фармакологической регуляции стволовых и прогениторных клеток для стимуляции сперматогенеза.

.....

UDC – 612.616:616.69

THE SEARCH OF NEW TARGETS FOR PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF SPERMATOGENESIS DISORDERS

Skurikhin E.G., Pakhomova A.V., Pershina O.V., Ermakova N.N., Krupin V.A., Pan E.S., Ermolaeva L.A., Dygai A.M.

Federal State Scientific Institution «Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine" Tomsk NRMC, Tomsk, Russia
643028, Tomsk, Lenin street, 3
E-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com

We detected stem/progenitor cells-targets for drug therapy of spermatogenesis disorders.

Keywords: stem cells, spermatogenesis, regeneration of testis

The infertile couple is one of the major social and health problems. Causes of male infertility are different. The therapy of hypogonadism is based on restoration of testosterone level. An alternative to hormone replacement therapy may be stimulation the regeneration of testicular tissue using by the pharmacological regulation of tissue-specific stem cells.

The aim of our study was to search the stem/progenitor cells targets for therapy of spermatogenesis disorders at the various diseases. Experiments were performed on C57BL/6 mice. We used ischemia testes, fat diet, models of type 2 diabetes, type 1 diabetes, busulfan administration to induce of spermatogenesis disorders. The materials of investigation were blood serum, pancreas and testes. We used functional, morphological, immunohistochemical and cytometric methods, ELISA, method of cell culture and transplantation test.

We evaluated the various populations of spermatogonial stem cells, endothelial and epithelial progenitor cells, angiogenic precursors, precursors of the stromal tissue from the genito-urinary system, mesenchymal stem cells in vivo and in vitro. We detected the potential stem/progenitor cells targets for each model of spermatogenesis disorders. Our view pharmacological regulation of stem cells and progenitor cells may be effective for spermatogenesis stimulation.

СЕКЦИЯ

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ микроРНК

SECTION

EXTRACELLULAR VESICLES AND CIRCULATING microRNA

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 57.088.3

ОСОБЕННОСТИ ХРАНЕНИЯ ЭКЗОСОМ ПРИ +4°С

Евтушенко Е. Г.[1*], Хомякова Е. Б.[2], Лившиц М. А.[3], Лазарев В. Н.[2], Багров Д. В.[4], Генерозов Э. В.[2], Говорун В. М.[2]

[1] Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
e-mail: evtushenko@enzyme.chem.msu.ru
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия
119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а
[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия
119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32
[4] Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Экспериментально продемонстрирована доминирующая роль адсорбции на стенках пробирок в снижении концентрации экзосом при хранении очищенных препаратов экзосом при +4°С. Проведено теоретическое моделирование этого процесса, хорошо согласующееся с экспериментальными данными. Выработаны практические рекомендации по кратковременному хранению препаратов экзосом при +4°С.

Ключевые слова: экзосомы, хранение, адсорбция, диффузия.

В лабораторной практике, связанной с выделением и использованием экзосом, часто возникает необходимость кратковременного хранения препаратов, содержащих экзосомы в их естественной среде (культуральные среды, образцы мочи, плазмы и т.д.) или препаратов очищенных экзосом. Известно, что заморозка экзосом зачастую приводит к их частичной агрегации, поэтому вопрос кратковременного (в течение 1-2 суток) хранения при +4°С оказывается весьма актуальным. Анализ литературных данных, относящихся к подобной практике, показывает, что концентрация экзсосом не снижается при их кратковременном хранении в сложных смесях (культуральные среды, сыворотка и плазма крови), однако для полностью или частично очищенных препаратов наблюдается значимое падение концентрации при хранении при +4°С в течение нескольких суток.

В настоящей работе экспериментально показано, что основной вклад в падение концентрации очищенных препаратов экзосом вносит их адсорбция на стенки пробирок. Теоретическое моделирование, основанное на модели свободной диффузии частиц в пробирке с их адсорбцией на стенки, демонстрирует хорошее соответствие с экспериментальной кинетикой падения концентрации частиц. Выработаны следующие практические рекомендации по кратковременному хранению экзосом при +4°С:

1. Для сохранения очищенных экзосом при +4°С наилучшими вариантами являются пробирки Ep-

pendorf Protein LoBind (падение концентрации около 10% за 48 часов) или пробирки, стенки которых заблокированы BSA (падение концентрации менее 10% за 48 часов).

2. Если возможен выбор между хранением очищенных экзосом и хранением экзосом в культуральной среде с тем чтобы выделять их непосредственно перед использованием, то второй вариант предпочтителен. Белки, экскретированные клетками в культуральную среду, блокируют стенки пробирок и предотвращают осаждение экзосом. В препаратах, хранившихся в течение 48 часов практически отсутствовало снижение концентрации экзосом.

.....

UDC 57.088.3

EXOSOMES STORAGE AT +4°C

Evtushenko E. G.[1*], Khomyakova E. B.[2], Livshits M. A.[3], Lazarev V. N.[2], Bagrov D. V.[4], Generozov E. V.[2], Govorun V. M.[2]

[1] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russia
1/3, Leninskie gory, Moscow, 119991
e-mail: evtushenko@enzyme.chem.msu.ru
[2] Research and Clinical Center of Physical Chemical Medicine, Moscow, Russia
1a, Malaya Pirogovskaya str, Moscow, 119435
[3] Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
32, Vavilova str., Moscow, 119991
[4] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia
1/12, Leninskie gory, Moscow, 119991

Prevailing contribution of exosomes adsorption on plastic tubes into their losses during storage of purified exosomes at +4°C has been shown. Theoretical model of exosomes adsorption with the mass transfer via diffusion-sedimentation has shown a good agreement with the experimental concentration decrease. Guidelines for exosomes short-term storage at +4°C were developed.

Key words: exosomes, exosomes storage, particles adsorption, particles diffusion.

The necessity of short-term storage of various exosomes containing samples (cultural media, urine, blood plasma, etc.) is pretty frequent in exosomes research. It's well-known, that freeze-thaw procedure often leads to partial aggregation of exosomes, thus, short-term storage (up to 48 h) at +4°C could be a promising alternative. The review of publications on this topic shows, that exosomes are rather stable in terms of their concentration in complex media (cultural media, blood serum, blood plasma), but show a substantial concentration decrease when stored purified at +4°C for few days.

We have shown, that the main source of exomes loses during their storage at +4°C is the adsorption on plastic tube walls. Theoretical model of particles adsorption with diffusion-sedimentation mass transfer shows a very good agreement with the measured concentration decrease. The following guidelines have been developed for short-term storage of exosomes at +4°C:

1. If purified exosomes have to be stored at +4°C the best options are Eppendorf Protein LoBind tubes (losses around 10% in 48 h) or BSA-blocked ordinary polypropylene tubes (less than 10% losses in 48 h).

2. If there is a choice between storage of purified exosomes and storage of exosomes-containing cultural medium with subsequent purification, the latter is preferable, because excreted proteins in cultural medium block the tube wall and prevent any exosomes losses during 48 h storage at +4°C.

.....

УДК 543.426, 577.352

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ BODIPY-МЕЧЕНЫХ ЛИПИДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ЭКОЗОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Дейген И.М[1]., Куценок Е.О.[1], Болдырев И.А.[2], Кудряшова Е.В.[1], Ефремова М.В.[1,3], Никитин А.В.[2], Ханни М.[4], Batrakova E.V.[4], Кабанов А.В.[1,4], Мажуга А.Г.[1,3], Головин Ю.И.[5], Клячко Н.Л[1].

[1] Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия, 119991 Ленинские горы, 1 стр 3
e-mail: i.m.deygen@gmail.com

[2] *ИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия, 117997, улица Миклухо-Маклая, 16/10*
[3] *НИТУ МИСИС, Москва, Россия, 119991, Ленинский проспект, 4*
[4] *Eshelman School of Chemistry, UNC Chapel Hill, 301 Pharmacy Ln, Chapel Hill, NC 27599, USA*
[5] *Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, Тамбов, Россия, 392000, ул. Интернациональная, 33*

В работе предложено использование BODIPY-меченого фосфатидилхолина для исследования состояния экзосомальной мембраны в присутствии магнитных наностержней и под действием ультразвука. Обнаружено, данные воздействия приводит к значительному уменьшению поляризации флуоресценции BODIPY-меченого липида, что указывает на разрыхление мембраны.

Ключевые слова: экзосомы, флуоресцентная спектроскопия, паклитаксел, УЗ-загрузка, низкочастотное магнитное поле.

На сегодняшний день значительный интерес у многих исследовательских групп вызывает использование экзосом как систем доставки лекарственных средств. При этом актуальным остается вопрос загрузки активной молекулы и контролируемого высвобождения. Данные процессы обычно сопряжены с разрыхлением экзосомальной мембраны; таким образом, необходим удобный и информативный метод анализа состояния мембраны. Флуоресцентные методы анализа традиционно используются для этих целей, к меткам-репортёрам предъявляют ряд требований: высокая интенсивность эмиссии флуоресценции, легкость встраивания в мембрану, расположение флуоресцентного фрагмента в гидрофобной части липидного бислоя, высокая чувствительность к изменению состояния мембраны. Перспективным представляется использование BODIPY-метки, конъюгированной с фосфолипидами – основными компонентами мембраны. В данной работе предложено использование B9PPC (1-palmitoyl-2-(ω-[4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-8-yl]-nonanoyl-*sn*- glycero-3-phosphocholine). Оптимизированы условия получения и очистки меченых экзосом и регистрации сигнала поляризации флуоресценции от метки. Показано, что под действием 6 циклов (30 сек\30 сек УЗ\пауза - 6 раз, 2 минуты во льду) ультразвука мембрана экзосом значительно разрыхляется: сигнал поляризации уменьшается с 813±10 до 370±10. Дополнительное встраивание липида DSPE-PEG, который способен делать мембрану жестче, приводит к увеличению сигнала поляризации до 830±10, т.е. к увеличению вязкости мембраны. В обоих случаях часовая инкубация при комнатной температуре приводила к восстановлению сигнала поляризации, что указывает на восстановление состояния мембраны. УЗ-воздействие обеспечивает эффективную загрузку паклитаксела. В присутствии магнитных наностержней в негреющем низкочастотном магнитном поле обнаружен аналогичный, но менее выраженный эффект разрыхления мембраны, что может приводить к контролируемому высвобождению содержимого.

Работы выполнена при поддержке гранта РНФ 14-13-00731

UDC 543.426, 577.352

BODIPY-LABELED LIPIDS ALLOW STUFY OF EXCOSOME MEMBTANE STATE

Deygen I.M. [1], **Kutsenok E.O.** [1], **Boldyrev I.A.**[2], **Kudryashova E.V.** [1], **Efremova M.V.** [1, 3], **Nikitin A.V.** [3], **Hanney M.** [4], **Batrakova E.V.** [4], **Kabanov A.V.** [1,4], **Majouga A.G.**[1,3], **Golovin Yu. I.** [5], **Klyachko N.L.** [1]

[1] *Department of Chemical Enzymology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia 119991 Leninskie gory, 1/3*
e-mail: i.m.deygen@gmail.com
[2] *M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia, 117997, Miklukho-Maklaya 16/10*
[3] *NITU MISIS, Moscow, Russia, 119991, Leninskii prospekt, 4*
[4] *Eshelman School of Chemistry, UNC Chapel Hill, 301 Pharmacy Ln, Chapel Hill, NC 27599, USA*
[5] *G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia, 392000, Internationalnaya, 33*

The paper proposed the use of BODIPY-labeled phosphocholine to study the state of exosomal membrane in the presence of magnetic nanorods and under ultrasonication. As we have found, the exposition of fields leads to a significant decrease in the fluorescence polarization of BODIPY-labeled lipid, indicating a loosening membrane integrity.

Key words: exosomes, fluorescent spectroscopy, paclitaxel, US-loading, low-frequency magnetic field.

To date, the significant interest in many research groups is the application of exosomes as a drug carrier. However it is an issue to load an active molecule and to obtain controlled release. These processes usually involve loosening exosomal membrane; thus, we need a convenient and informative method of analyzing its state. Fluorescent methods are traditionally used for these purposes; to labels-reporters one requires a number of desirable properties: high intensity of fluorescence emission, easy incorporation, the location of a fluorescent moiety directly to the hydrophobic portion of the lipid bilayer, high sensitivity to changes in the membrane state. Promising approach is the use of BODIPY-label conjugated to phospholipids - the main components of the membrane. In this paper, we suggested the use of B9PPC (1-palmitoyl-2- (ω- [4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacen-8-yl]-nonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). We have found the optimized conditions of preparation and purification of labeled exosomes and recording the fluorescence polarization signal from the label. We have shown that under the influence of 6 cycles of ultrasonication (30 s US\ 30 s pause - 6 times, 2 minutes on ice) membrane of exosome is getting more fluid: a polarization signal is reduced from 813 ± 10 to 370 ± 10. An addition of lipid DSPE-PEG, which is able to make the membrane harder, increases the polarization signal to 830 ± 10, i.e. increases the viscosity of the membrane. After sonication, one hour is required for recovery of the polarization signal that indicates recovery of membrane state. Sonication provides efficient loading of paclitaxel. In the presence of magnetic nanorods in non-heating low-frequency magnetic field we have detected similar but less pronounced effect of loosening the membrane that can lead to a controlled release of the contents.

The work was supported by grant RSF 14-13-00731

УДК 576.54

ЭКЗОСОМЫ, КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЭКЗОГЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКИ-РЕЦИПИЕНТЫ

Бурдаков В.С.[1,2], Варфоломеева Е.Ю.[1], Байрамуков В.Ю.[1] , Ланда С.Б.[1], Штам Т.А.[1], Филатов М.В.[1]

[1] Петербургский Институт Ядерной Физики им. Б.П.Константинова, Россия, 188300, Ленинградская обл., г.Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1, ФГБУ ПИЯФ
[2] Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
e-mail: burdakov_vs@mail.ru

Из конденсированной культуральной среды были выделены внеклеточные везикулы, которые были охарактеризованы как экзосомы. Было показано, что данные частицы имеют бимодальное распределение по размерам: 20 и 90нм, Было продемонстрировано, что экзосомы способны передавать клеткам-реципиентам как уже имеющиеся в них белки, так и нагруженные в них различными способами экзогенные нуклеиновые кислоты.

Ключевые слова: экзосомы, выделение, нагрузка, доставка, протеом, белки, siRNA, DNA, флуоресцентная метка.

В последние годы значительное внимание привлекает новое биологическое явление, связанное с секрецией различными клетками частиц нанометрового размера, получивших название экзосом. Биологическое значение этого нового феномена остается не вполне ясным и привлекает значительный и бурно возрастающий интерес исследователей. Имеющиеся данные свидетельствуют о причастности экзосом к осуществлению межклеточных взаимодействий и к патогенезу различных заболеваний. Структурные и функциональные особенности экзосом требуют дальнейшего изучения, равно как и методы их обнаружения в физиологических жидкостях и способы очистки. В представленной работе экзосомы, секретируемые различными клеточными линиями человека исследовали методами масс-спектрометрии, электрофореза, иммуноблоттинга, атомно-силовой микроскопии и спектроскопии. Также в данном исследовании были предложены и опробованы несколько уникальных подходов к детектированию и выделению экзосом из культуральной среды. Используя эти методы, мы показали, что экзосомы имеют бимодальное распределение по размеру: 20 и 90 нм. Нами было продемонстрировано, что экзосомы могут доставлять собственные белки в клетки-реципиенты. Также, мы показали, что экзосомы могут быть нагружены экзогенными нуклеиновыми кислотами и способны, также, доставлять их в клетки, доставка флуоресцентно меченных siRNA и DNA в клетки была подтверждена методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии.

Чтобы проверить эффективность доставки siRNA в клетки с помощью экзосом, экзосомы были нагружены siRNA против RAD51, нокаут этого гена должен вызывать репродуктивную клеточную гибель, после добавления к клеткам экзосом с siRNA против RAD51 мы наблюдали массовую клеточную гибель, в то время, как добавление экзосом с контрольной siRNA не оказывало на клетки никакого эффекта.

In recent years, considerable attention has attracted by new biological phenomenon, associated with the secretion of nano-sized particles, called exosomes, by different cell types. The biological significance of this new phenomenon is not entirely clear and involves a significant and rapidly growing interest of researchers. Available data suggest the involvement of exosomes in cell-cell interactions and the pathogenesis of various diseases. Structural and functional features of exosomes require further investigation, as well as methods of their detection and purification from physiological fluids. In the current study, the exosomes from different human cell lines was examined in vitro by mass spectrometry, one and two-dimensional electrophoresis, immunoblotting, atomic force microscopy, and light-scattering methods. The current study employed several original approaches as isolating exosomes from the cultural media by causing exosomes aggregation with phytohemagglutinin. Using these methods, we have shown that exosomes have a bimodal size distribution: 20 and 90 nm. Also, we demonstrate that exosomes can be loaded with nucleic acids and deliver it to recipient cells in vitro. The delivery of fluorescently labeled siRNA and short DNA via exosomes to cells was confirmed using flow cytometry. Two different siRNAs against RAD51 and RAD52 were used to transfect into the exosomes for therapeutic delivery into target cells. The exosome-delivered siRNAs were effective at causing post-transcriptional gene silencing in recipient cells.

УДК 577.29

АНАЛИЗ ПРОТЕОМА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭКЗОСОМ

Тамкович С. Н., Тутанов О. С., Центалович Ю. П., Сомов А. К., Карпухина К. В., Юнусова Н. В., Войцицкий В. Е., Власов В. В., Лактионов П. П.

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8
e-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru

Циркулирующие в плазме и связанные с форменными элементами крови экзосомы выделены ультрацентрифугированием и охарактеризованы в соответствии с требованиями Extracellular vesicles society. Белки экзосом идентифицированы при помощи масс-спектрометрии и анализа пептидов в базе SwissProt. С помощью базы RefSeq установлены локализация и функции обнаруженных белков.

Ключевые слова: экзосомы, кровь, масс-спектрометрия, протеомика.

Известно, что эндогенные экзосомы циркулируют в плазме крови, а также связаны с форменными элементами [1]. В представленной работе мы исследовали состав и функции белков экзосом, свободно циркулирующих в плазме и экзосом, связанных с поверхностью клеток крови здоровых женщин и больных раком молочной железы.

Плазма крови и элюаты с поверхности форменных элементов были получены по разработанному ранее протоколу [2]. Экзосомы селектировали по размеру фильтрацией через 0,1 мкм фильтры и осаждали ультрацентрифугированием при 100,000g. Препараты экзосом характеризовали при помощи трансмиссионной электронной микроскопии, проточной цитофлуорометрии и трекового анализа на приборе Malvern NS-300. Для идентификации белков экзосом после SDS-диск электрофореза гель разрезали на фрагменты (шаг 3 мм, от 10 до 250 кДа), гидролизовали трипсином, полученные пептиды элюировали из геля и идентифицировали при помощи время-пролетной MALDI TOF/TOF и maXis 4G масс-спектрометрии. Белки идентифицировали при помощи поиска пептидов-кандидатов в базе SwissProt с использованием программы Mascot. С помощью базы данных RefSeq устанавливали локализацию и функцию экзосомальных белков.

При помощи трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что везикулы диаметром 30-100 нм присутствуют как в плазме, так и на поверхности клеток крови, микровезикулы обеих фракций экспрессируют тетраспанины CD9, CD24, CD63, CD81. По данным трекового анализа 2/3 экзосом крови связаны с поверхностью форменных элементов; концентрация везикул в крови не изменяется при развитии онкологического заболевания. В пилотном эксперименте было достоверно идентифицировано 76 белков в составе экзосом крови, из которых 49 были обнаружены в составе экзосом впервые (согласно базе данных Exocarta на ноябрь 2016). По данным 2D-электрофореза, 40% белков экзосом плазмы крови

идентичны белкам экзосом, связанных с форменными элементами. Наиболее представлены в составе экзосом мембран-связывающие белки и внеклеточные белки. Показано, что часть экзосомальных белков вовлечена в регуляцию гуморального иммунного ответа, положительную регуляцию метаболизма липидов, формирование и выведение протеолипидных частиц, а также в регуляции ответа на стресс и воспаление. Входящие в состав экзосом белки обладают способностью связываться с поверхностью эукариотических клеток, а также с ферментами, с бета-амилоидом, с шаперонами и с глюкозоаминогликанами; кроме того, экзосомальные белки связываются с рецепторами к аполипопротеину A-I и липопротеинам низкой плотности. Среди экзосомальных белков обнаружены регуляторы активности ферментов: эндопептидаз, супероксид-генерирующей NADPH оксидазы, фосфотидилхолин-стерол О-ацетилтрансферазы и других. Данные об экспрессии белков в составе экзосом указывают на то, что они могут связываться с поверхностными белками клеток и выполнять роль межклеточных транспортеров биомолекул.

Литература:
1. *Tamkovich S., Tutanov O., Grigor'eva A., Duzhak T., Kirushina N., Permyakova V., Ryabchikova E., Voicitsckyi V., Vlassov V., Laktionov P. Blood cell-surface-bound exosomes as a new source of tumor-specific microRNA//EJC Supplements 2015. Vol. 13. N 1. P. 59-60.*
2. *Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Тутанов О.С., Рябчикова Е.И., Григорьева А.Е., Власов В.В. Способ получения экзосом из крови // Патент России № 2556825 от 18.06.2015.*

UDC 577.29

PROTEOME OF EXOSOMES CIRCULATING IN BLOOD

Tamkovich S. N., Tutanov O. S., Tsentalovich Y. P., Somov A. K., Karpukhina K. V., Yunusova N. V., Voytsitskiy V. E., Vlassov V. V., Laktionov P. P.

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

Exosomes from plasma and blood cell surface were isolated by ultracentrifugation and characterized in accordance with the recommendations of the Extracellular vesicles society. Exosomal proteins were identified by mass-spectrometry and subsequent peptide analysis using SwissProt database. Localization and function of identified proteins were found out using RefSeq database.

Key words: exosomes, blood, mass-spectrometry, proteomics.

It was known that endogenous exosomes are circulated in blood plasma and being bound with blood cell surface [1]. In the present work we investigated content and functions of exosomal proteins from blood of healthy females and breast cancer patients.

Plasma and blood cell surface eluate were obtained using previously published protocol [2]. Exosomes were pelleted at 100,000 g from 0.1 μm filtered supernatants. Samples of exosome were characterized by TEM, flow cytometry and nanoparticle tracking analysis at Malvern NS-300. Exosomal proteins were separated by SDS-PAGE, the gel was cutted and 3 mm width slides were treated with trypsin. Peptides were eluted from gel and identified by MALDI TOF/TOF and maXis 4G mass-spectrometry. Proteins were identified using Mascot program and SwissProt database. Localization and function of exosomal proteins were analyzed using RefSeq database.

TEM demonstrate presence of exosomes in 30-100 nm membrane–wrapped particles isolated from both plasma and blood cell surface eluates. The presence of tetraspanines CD9, CD24, CD63, CD81 was confirm by flow cytometry. Nanoparticle tracking analysis demonstrates that 2/3 of total blood exosomes are associated with blood cell surface and exosomes concentration do not vary between blood samples of healthy donors and cancer patients. 2D-SDS PAAGE demonstrate coincidence of 40% of proteins in exosomes of both fractions. In pilot study 76 exosomal proteins 49 of which were found at the first time (according to the data on the basis of Exocarta November 2016) were identified. Membrane-binding proteins and extracellular proteins were the most represented proteins of blood exosomes. It was shown that a part of exosomal proteins are involved in the regulation of the humoral immune response, up-regulation of lipid metabolism, the formation and excretion proteolipid particles and also in response to stress and inflammation. The proteins were shown to mediate binding to the surface of eukaryotic cells and binding with enzymes, beta-amiloid, shaperones and glucosaminoglycanes as well as with apolipoprotein A-I receptor and low-density lipoprotein receptor. Some exosomal proteins regulate activity of the

enzyme such as endopeptidases, superoxide-generating NADPH oxidase, phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase, etc. Data on the expression of cell surface binding proteins confirm exosomes as interacellular transporters of biomolecules.

References:
1 Tamkovich S., Tutanov O., Grigor'eva A., Duzhak T., Kirushina N., Permyakova V., Ryabchikova E., Voicitsckyi V., Vlassov V., Laktionov P. Blood cell-surface-bound exosomes as a new source of tumor-specific microRNA//EJC Supplements 2015. Vol. 13. N 1. P. 59-60.
2. Tamkovich S.N., Laktionov P.P., Tutanov O.S., Ryabchikova E.I., Grigor'eva A.E., Vlassov V.V. Method of exosome isolation from blood // Russian patent № 2556825 from 18.06.2015.

УДК 577.359

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНОГО СОДЕРЖИМОГО ЭКЗОСОМ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ MCF-7

Чернышёв В.С., Ал-Хаками, С., Стиджлмен, И., Ракамадугу, Р., Бернард, Ф., Скляр, М.

Сколковский Институт Науки и Технологий, Москва, Россия
143026, Москва, ул. Нобеля, д. 3
По совм.: Московский Физико-Технический Институт, Долгопрудный, Россия
141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9
e-mail: V.Chernyshev@skoltech.ru
Телефон: +7-916-607-40-54

Популяция экзосом, выделенных из клеточной линии MCF-7, была разделена на субпопуляции на основе их физических характеристик, таких как размер и масса. Было показано, что содержимое экзосом зависит от их физических характеристик.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, экзосомы, рак молочной железы, фракционирование поля потока, микроРНК, маркеры

Экзосомы и другие внеклеточные везикулы (ВВ) являются стабильными мембраносодержащими частицами с диаметром 20-120 нанометров (нм), выделяемые в кровь практически всеми видами клеток, включая эпителиальные клетки, мезенхимальные клетки, лимфоциты и раковые клетки. Экзосомы транспортируются во внеклеточное пространство путем экзоцитоза (направленного транспорта), как результат формирования мультивезикулярных телец (МВТ) клеткой-отправителем. В результате этого, экзосомы и ВВ, попадая во внеклеточное пространство, могут быть обнаружены в любой жидкости организма, включая кровь, мочу и слюну. Они содержат нуклеиновые кислоты (в частности микро-РНК и другие некодирующие РНК) и белки, окруженные мембраной клетки-отправителя. Именно количество и вид нуклеиновых кислот, содержащихся в экзосомах, являются основным предметом исследований и обсуждений, поскольку экзосомы играют важную роль в межклеточной коммуникации, где микро-РНК может быть доставлена другим клеткам-реципиентам (адресатам) путем слияния экзосом с мембранами и последующим выходом РНК и других высокомолекулярных органических веществ в цитоплазму этих клеток.[1] Метод фракционирования в потоке в ассиметричном/центробежном поле (FFF) для выделения субпопуляций экзосом с различными физическими свойствами применяется не так часто, хотя имеет большой потенциал.[2] В докладе будут представлены результаты фракционирования в потоке в асимметричном поле (A-FFF) и центробежном поле (C-FFF) популяции экзосом, выделенных из клеточной линии рака молочной железы (MCF-7). Анализ экзосом показал явную корреляцию между их физическими свойствами и молекулярным составом, тем самым демонстрируя гетерогенность всей популяции. Возможность выделения субпопуляции экзосом с определенными физическими свойствами может стать полезным инструментом для их более глубокого изучения.

Литература:
1. Chernyshev V. et al. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes // Anal. Bioanal. Chem. 2015. Vol 407. № 12. P. 3285-3301.
2. Taylor D.D., Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. // Methods. 2015. Vol 87. P. 3-10.

UDC 577.359

HETEROGENEITY OF MOLECULAR CONTENT OF MCF-7 CELL LINE EXOSOMES

Chernyshev, V.S., Al-Hakami, S., Stijleman, I., Rachamadugu, R., Bernard, P., Skliar, M.

Primary: Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia
143026, Moscow, Nobel Street, 3
Secondary: Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia
141701, Moscow Region, Dolgoprudny, Institute Street, 9
e-mail: V.Chernyshev@skoltech.ru
Phone: +7-916-607-40-54

A population of exosomes extracted from the MCF-7 cell line was fractionated into subpopulations based on their physical properties such as size and mass. It was shown that exosome cargo correlates with physical properties.

Key words: extracellular vesicles, exosomes, breast cancer, field flow fractionation, microRNA, markers

Exosomes and other extracellular vesicles (EV) are stable membrane-bound particles with a diameter of 20-120 nanometers (nm), secreted into circulation by virtually all cell types, including epithelial cells, mesenchymal cells, lymphocytes and cancer cells. Exosomes are transported into the extracellular space by exocytosis (targeted delivery) as a result of the formation of multivesicular bodies (MW) in the cell of origin. As a result, exosomes and EV entering the extracellular space can be found in any body fluid, including blood, urine and saliva. They contain nucleic acids (including microRNAs and other non-coding RNAs) and proteins, surrounded by a membrane of the mother cell. The amount and type of nucleic acids contained in exosomes are now the main subjects in research and discussion, since exosomes play an important role in intercellular communication where micro-RNA can be delivered to other recipient cells by exosome fusion with the cell membrane and the subsequent release of RNA as well as other organic substances into the cytoplasm of the recipient cell.[1] Application of the Field Flow Fractionation (FFF) method for obtaining subpopulations of exosomes based on differences in their physical properties is still uncommon in this area of research but has a great potential.[2] Results after Asymmetric Field Flow Fractionation (A-FFF) and Centrifugal Field Flow Fractionation (C-FFF) of a population of exosomes isolated from the breast cancer cell line (MCF-7) will be presented. Analysis of exosomes showed a clear correlation between their physical properties and molecular content showing their heterogeneity. The ability to precisely isolate a subpopulation of exosomes with specific physical properties can become a useful tool and push exosome research forward.

References:
1. *Chernyshev V. et al. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes // Anal. Bioanal. Chem. 2015. Vol 407. № 12. P. 3285-3301.*
2. *Taylor D.D., Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. // Methods. 2015. Vol 87. P. 3-10.*

УКД 576.54

АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭКЗОСОМ – МЕТОД ПЕРВИЧНОЙ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Самсонов Р.Б. [1,2], Чебуркин Ю.В.[1,2], Штам Т.А. [1,2], Малек А.В. [1,2]

[1] ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия
197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68
[2] ООО «Онко-система», Москва, Россия
143026, г. Москва Территория инновационного центра «Сколково», ул. Луговая, д. 4

С целью создания метода диагностики и мониторирования лечения онкологических заболеваний, была разработана и оптимизирована для клинического применения технология выделения экзосом из различных биологических жидкостей. Предложен ряд подходов первичной или дифференциальной диагностики

на основе анализа биохимического состава (мембранные белки, микроРНК) выделенных экзосом.

Ключевые слова: экзоосмы, диагностика, скрининг, онкология, рак предстательной железы, рак щитовидной железы.

Экзосомы – класс наноразмерных мембранных везикул, секретируемые клетками различных тканей и органов в межклеточное пространство и физиологические жидкости. Биохимический состав экзосом отражает биологию и состояние клетки-продуцента. Экзосомы могут «акцептироваться» клетками ближайшего окружения или клетками, анатомически отдаленных органов, опосредуя, как предполагается, межклеточный транспорт веществ и информации на пара- и эндокринном уровне.

Биохимический состав экзосомы, секретируемых опухолевыми клетками, имеет ткане- специфические характеристики и отражает особенности злокачественной трансформации (т.н. «hallmarks of cancer» [1]). С учетом относительной биохимической стабильности экзосом и возможности их изоляции из биологических жидкостей, экзосомы представляют собой перспективный онко-маркер. Возможность проведения комплексного биохимического анализа определяет высокую специфичность такого метода по сравнению с существующими тестами, основанными на детекции молекулярных онкомаркеров.

С учетом особенностей состава различных физиологических жидкостей, были разработаны методы изоляции экзосом из мочи и плазмы. В первом случае применялась технология агглютинации экзосом с помощью лектинов с последующим центрифугированием [3]. Во втором случае экзосомы изолировались путем иммуно-преципитации на латексные частицы, связанные с антителами к белкам – поверхностным экзосомальным маркерам (CD9, CD63). При этом обогащение выделяемого препарата экзосомами опухолевого проихождения достигалось путем использования антител к белку TM9SF4, экспрессия которого ассоциирована с процессом анаэробного гликолиза.

Используя перечисленные методы изоляции, был проведен анализ состава микроРНК в экзосомах, выделенных из плазмы пациентов с различными онкологическими заболеваниями. Так, было показано, анализ miR-574-3p, miR-141-5p, and miR-21-5p в экзосомах мочи может быть использован для диагностики рака предстательной железы [3]. Анализ соотношения концентраций двух молекул (miRNA-21 и miRNA-181a-5p) в экзосомах, выделенных из плазмы пациентов с раком щитовидной железы, может быть использован для дифференциальной диагностики папиллярного и фолликулярного типов рака [2]. Клиническая значимость такого анализа определяется различиями прогноза и лечебной тактики при папиллярном и фолликулярном вариантах рака, и неудовлетворительной информативностью существующего подхода (цитологическое исследование материала, полученного путем тонко-игольной биопсии). При анализе состава микроРНК популяции экзосом плазмы, обогащенной экзосмами опухолевого происхождения, было показано, что на основе анализа отношения концентраций miRNA-29b, miRNA-181a и miRNA-200 можно основывать метод диагностики и контроля эффекта лечения колоректального рака [4]. Предварительные данные получены также при анализе состава микроРНК из экзосом, выделенных из плазмы пациенток с раком молочной железы и хроническими заболеваниями поджелудочной железы.

Литература:

1. *Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. -- 2011. -- Mar 04. -- T. 144, № 5. -- C. 646-74.*
2. *Samsonov R., Burdakov V., Shtam T., Radzhabovsmall a C. Z., Vasilyev D., Tsyrlina E., Titov S., Ivanov M., Berstein L., Filatov M., Kolesnikov N., Gil-Henn H., Malek A. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer // Tumour Biol. -- 2016. -- Sep. -- T. 37, № 9. -- C. 12011-12021.*
3. *Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic // Prostate. -- 2016. -- Jan. -- T. 76, № 1. -- C. 68-79.*
4. *Самсонов Р. Б., Штам Т. А., Бурдаков В. С., Малек А. В. Выделение и комплексный анализ биохимического состава экзосом плазмы – перспективный метод диагностики колоректального рака // Успехи молекулярной онкологии. -- 2016. -- Т. 3, № 4. -- С. 97.*

UDC 576.54

ANALYSIS OF BIOCHEMICAL COMPOSITION OF EXOSOMES FOR PRIMARY AND DIFFERENTIAL CANCER DIAGNOSTICS

Samsonov R.B. [1,2], Cheburkin Y.V. [1,2], Shtam T.A. [1,2], Malek A.V. [1,2]

[1] N.N. Petrov Institute of Oncology, Saint-Petersburg, Russia
197758, Saint-Petersburg, Pesochny, Leningradskaya 68.
[2] Oncosystem Ltd., Moscow, Russia
143026, Moscow, Innovation center "Skolkovo", Lugovaya 4.

Methods of exosomes isolation from biological fluids were developed and optimized for clinical application with a purpose to cancer diagnostic and monitoring. We have proposed new approaches of primary and differential cancer diagnostic based on assessment of the biochemical composition (membrane proteins, miRNA) of isolated exosomes.

Key words: exosomes, diagnostic, screening, cancer, prostate cancer, thyroid cancer

Exosomes are membrane nanovesicles secreted by cells of different origin into interstitial space and physiological fluids. Biology and conditions of the cells are reflected by biochemical composition of secreted exosomes. Exosomes secreted by one cell may be accepted by other cells in close environment or distantly. Such type of vesicular communication mediates intercellular interchange of substances and signals on the para- and endocrine levels.

Biochemical composition of exosomes secreted by tumor cells has tissue-specific characteristics and reflects events of neoplastic transformation, so-called «hallmarks of cancer» [1]. Considering biochemical stability of exosomes and possibility of their isolation from physiological fluids, exosomes present a promising cancer marker. Complex analysis of exosomes may define high specificity of exosome-based diagnostic approaches comparing with existing tests based on evaluation of single molecular markers.

Given the nature of the composition of a variety of body fluids, we developed methods for the isolation of exosomes from urine and plasma. In the first case, the agglutination of exosomes by lectins was applied and followed by centrifugation [3]. In the second case, exosomes were isolated by immuno-precipitation on the latex particles coupled with antibodies against exosomal surface markers (CD9, CD63). To enrich exosomal population by particles of tumor origin we used antibodies against the protein TM9SF4, the expression of which is associated with the process of anaerobic glycolysis.

Using these methods of isolation, we analyzed composition of microRNAs in exosomes isolated from biological fluids of cancer patients. Thus, it was demonstrated that analysis miR-574-3p, miR-141-5p, and miR-21-5p in urinary exosomes can be used to diagnose prostate cancer [3]. The ratio of the concentrations of two molecules (miRNA-21 and miRNA-181a-5p) in exosomes isolated from plasma of patients with thyroid cancer, can be used for differential diagnosis of papillary and follicular cancer types [2]. The clinical relevance of this analysis is defined by different prognosis and treatment strategy as well as insufficient performance of the approach applied currently (cytological examination of material obtained by fine-needle biopsy). In parallel, we have shown that assessment of miRNA-29b, miRNA-181a and miRNA-200 relative concentration can be used for diagnostic and monitoring of therapeutic outcome for colorectal cancer [4]. Preliminary data are also obtained by about the composition of exosomal microRNA isolated from plasma of patients with breast cancer and chronic diseases of the pancreas.

References:

1. *Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. -- 2011. -- Mar 04. -- T. 144, № 5. -- C. 646-74.*
2. *Samsonov R., Burdakov V., Shtam T., Radzhabovsmall a C. Z., Vasilyev D., Tsyrlina E., Titov S., Ivanov M., Berstein L., Filatov M., Kolesnikov N., Gil-Henn H., Malek A. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer // Tumour Biol. -- 2016. -- Sep. -- T. 37, № 9. -- C. 12011-12021.*
3. *Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic // Prostate. -- 2016. -- Jan. -- T. 76, № 1. -- C. 68-79.*
4. *Samsonov R.B., Shtam T.A., Burdakov V.S., Malek A.V. Isolation and complex analysis of biochemical composition of plasma exosomes - new method for colorectal cancer diagnostic // Advances in Molecular Oncology. -- 2016 - 3(4): 97*

УДК 577.29

РОЛЬ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ЭСТРОГЕНРЕЗИСТЕНТНОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Семина С. Е., Красильников М. А.

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия
115478, Россия, г.Москва, Каширское шоссе, 24,стр 15
e-mail: s.e.semina@gmail.com

Впервые показано, что ко-культивирование эстрогензависимых и резистентных клеток рака молочной железы приводит к развитию гормональной резистентности эстрогензависимых клеток. Решающим фактором в подобном «горизонтальном» пути передачи резистентности являются межклеточные взаимодействия, реализуемые в том числе с участием экзосом, продуцируемых резистентными клетками.

Ключевые слова: рак молочной желез; гормональная резистентность; экзосомы.

Эффективность гормональной терапии злокачественных новообразований, в том числе рака молочной железы, во многом ограничена развитием резистентности к гормонам, как врожденной, так и приобретенной (под последней подразумевают резистентность к гормональным препаратам, развившуюся в процессе терапии). Собственно проблеме гормональной резистентности злокачественных новообразований посвящено достаточно много работ, установлены основные пути развития резистентости, подробно исследованы модели резистентности in vitro. Потеря клетками гормональной зависимости может быть обусловлено как снижением содержания рецепторов гормонов, так и подавлением активности рецепторов, вызываемым различными факторами, в том числе – лиганд-независимой активацией рецептора, нарушением баланса между белками-активаторами и супрессорами рецептора, стимуляцией гормоннезависимых сигнальных путей, идущих в обход рецепторов гормонов [1, 3, 7]. Существенно меньше известно относительно роли межклеточных взаимодействий в развитии гормональной резистентности опухолей.

Мы предположили, что появление в опухоли популяции клеток, резистентных к гормонам, и дальнейший совместный рост гормоночувствительных и резистентных клеток может стимулировать распространение гормональной резистентности и на чувствительные клетки – за счет продукции специфических факторов и их воздействия на соседние клетки, в том числе паракринным путем или через собственно межклеточные контакты

На моделях клеток эстрогензависимого рака молочной железы (MCF-7) и резистентной субпопуляции (MCF-7/T), полученной путем длительного культивирования клеток MCF-7 с антиэстрогеном тамоксифеном, была исследована возможность изменения гормональной чувствительности этих клеток при их ко-культивировании in vitro. Для этого гормонрезистентные клетки MCF-7/T трансфецировали GFP-содержащей плазмидой с последующей селекцией GFP-позитивных клонов. В итоге нам удалось получить клоны MCF-7/T /GFP+/, стабильно продуцирующие GFP, что позволяло различать устойчивые и родительские клетки во время совместного культивирования.

Для изучения влияния совместного культивирования клеток на чувствительность к тамоксифену родительские клетки MCF-7 (GFP-негативные) прекультивировали в течение 10 сут с резистентными MCF-7/T /GFP+/ клетками, затем клетки инкубировали с тамоксифеном и определяли эффективность торможения роста для каждого типа клеток. Оказалось, что совместное культивирование родительских и резистентных клеток приводит к заметному повышению устойчивости родительских клеток к тамоксифену, что свидетельствует о важной роли контактов, прямых или опосредованных, между гормончувствительными и резистентными клетками в развитии и распространении гормональной резистентности.

Далее, из GFP-негативных клеток MCF-7, прошедших ко-культивирование с резистентными клетками MCF-7/T/ GFP +/ , были клонированы отдельные клетки и проанализирована чувствительность полученного клеточного клона к тамоксифену. Оказалось, что такая культура (MCF-7/R) действительно характеризуется относительной резистентностью к тамоксифену, которая сохраняется в течение не менее 80 сут при культивировании в стандартных условиях. Более того, эти клетки характеризовались сниженной активностью рецептора эстрогенов ERalpha и активацией Snail1-E-кадхерин сигналинга - изменениями, характерными для развития гормональной резистентности клеток рака молочной железы.

Установлено, что одним из способов сообщения клеток друг с другом являются экзосомы [2, 4-6]. Для изучения роли экзосмом в развитии гормональной резистентности этрогенчувствительные клетки MCF-7

культивировали с экзосомами, полученными от резистентных клеток MCF-7/T, в течение 72 часов. Оказалось, что в таких клетках отмечается подавление активности ERalpha и повышение трансрепрессорной активности Snail1. При более длительном культивировании MCF-7 с экзосомами, в течение 30 суток, наблюдается снижение пролиферативной активности клеток. При этом культивирование MCF-7 со своими собственными экзосомами такого эффекта не оказывает.

В целом, мы рассматриваем полученные результаты как косвенные свидетельства возможного участия межклеточных взаимодействий, в частности экзосом, в развитии и распространении гормональной резистентности, и рассчитываем, что дальнейшее продолжение этих исследований позволит установить механизм этого эффекта и его значение в формировании гормонрезистентного фенотипа злокачественных опухолей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01031.

Литература:

1. *Andreeva, O.E., Shcherbakov, A.M., Shatskaia, V.A., and Krasil'nikov, M.A. [The role of transcription factor Snail1 in the regulation of hormonal sensitivity of in vitro cultured breast cancer cells] // Voprosy onkologii.– 2012.-Vol. 58, № 1 - P.71-76.*
2. *Harris, D.A., Patel, S.H., Gucek, M., et al. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement // PloS one.– 2015.-Vol. 10, № 3 - P.e0117495.*
3. *Kim, M.R., Choi, H.K., Cho, K.B., et al. Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells // Cancer science.– 2009.-Vol. 100, № 10 - P.1834-1841.*
4. *Lopes-Rodrigues, V., Di Luca, A., Sousa, D., et al. Multidrug resistant tumour cells shed more microvesicle-like EVs and less exosomes than their drug-sensitive counterpart cells // Biochimica et biophysica acta.– 2016.-Vol. 1860, № 3 - P.618-627.*
5. *Lv, M.M., Zhu, X.Y., Chen, W.X., et al. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein // Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.– 2014.-Vol. 35, № 11 - P.10773-10779.*
6. *Raposo, G., and Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends // The Journal of cell biology.– 2013.-Vol. 200, № 4 - P.373-383.*
7. *Scherbakov, A.M., Andreeva, O.E., Shatskaya, V.A., and Krasil'nikov, M.A. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells // Journal of cellular biochemistry.– 2012.-Vol. 113, № 6 - P.2147-2155.*

.....

UDC 577.29

THE ROLE OF INTRECELLULAR INTERACTIONS IN THE DEVELOPMENT OF THE ESTROGE-INDEPENDENT PHENOTYPE OF BREAST CANCER CELLS

Semina S.E., Krasil'nikov M.A.

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Russian Academy of Medical Sciences, Moscow
115478 Russia, Moscow, Kashirskoe shosse, 24, build 15
e-mail: s.e.semina@gmail.com

The results presented demonstrate that co-cultivation of the estrogen-sensitive and resistant breast cancer cells led to progression of hormonal resistance of estrogen-sensitive cells. The key factors respondent for the horizontal transferring of hormonal resistance may be based on the intercellular interactions mediated, at least in a part, via exosomes of the resistant cells.

Key words: breast cancer; hormonal resistance; exosomes.

The efficiency of endocrine therapy of tumors, including breast cancer, is limited by development of hormone-independent tumors which are resistant to antiestrogens initially or acquire resistance under prolonged therapy with antiestrogens (tamoxifen, raloxifene). The mechanism of hormonal resistance was investigated thoroughly, the main ways of the progression of hormonal resistance as well as the models of the resistance in vitro were revealed. The primary or acquired hormonal resistance may be associated with the loss of estrogen receptors as well as with receptor dysregulation caused by various factors including ligand-independent receptor activation, disbalance between receptor activators and repressors, stimulation of hormone-independent pathways etc. [1, 3, 7]. It is less known about the role of the intercellular interactions in the progression of hormonal resistance.

We hypothesized, that the formation of the clone of the hormone-resistant cells in the tumor, and the subsequent common growth of the hormone-resistant and sensitive cells may lead to spread the hormonal resistance to the sensitive cells – as a result of the secretion of the specific factors acting through the direct cell-cell contacts or in the paracrine manner.

Here, using the estrogen-dependent breast cancer cells MCF-7 and the resistant subline MCF-7/T developed by long-term cultivation of MCF-7 cells in the presence of antiestrogen tamoxifen, we investigated the possible changes in the hormonal sensitivity of these cells caused by the co-cultivation in vitro. For this purpose MCF-7/T cells were transfected with the plasmid containing the gene of the green fluorescent protein (GFP), and GFP-positive hormone-resistant subline MCF-7/T/ GFP+ was developed. The GFP expression should allow to distinguish the resistant and parental cells during co-cultivation.

To study the influence of the co-cultivation on the cell sensitivity to tamoxifen the parent MCF-7 cells (GFP-negative) were co-cultivated with the resistant MCF-7/T/ GFP+/ cells for 10 days, then the cells were treated with tamoxifen and the efficiency of growth inhibitory tamoxifen action was determined. We found that the co-cultivation of the parent and resistant cells lead to increase in the resistance of the parent cell to tamoxifen, indicating the important role of the contacts, direct or indirect, between hormone sensitive and resistant cells in the development of hormone resistance. Afterwards, the MCF-7 cells after co-cultivation with MCF-7/T/ GFP+/ cells were cloned and sensitivity of isolated clone (named as clone R) to tamoxifen was analyzed. We found that clone R is more resistant to tamoxifen if compare with control clone C (isolated from the non-treated MCF-7 cells) and retains the tamoxifen resistance for at least 80 days of autonomous growth – demonstrating the irreversible character of such resistance. Moreover, it was found that clone R was characterized with the decrease in the estrogen receptor (ER) transcriptional activity and increase in the expression and transcriptional activity of Snail1 - the changes associated with the progression of hormonal resistance.

The exosomes and their role in the cell-cell communications are discussed broadly [2, 4-6]. To study the role of exosomes in the development hormone-independent phenotype, the estrogen-dependent MCF-7 cells had been cultivating with exosomes from MCF-7/T resistant cells for 3 days. It was found that the treated cells were characterized with the inhibition of ERalpha activity and activation of Snail1signaling. In addition, cultivation of MCF-7 with MCF-7/T`s exosomes for 30 days lead to a decrease of the cell proliferation. The above mentioned changes characterize the development of estrogen-independent cell phenotype, whereas the cultivation of MCF-7 with its own exosomes has no such effect.

In general, we evaluate the established results as the first evidence of the possible involvement of the cell-cell interrelations, in particular exosomes, in the realization of the hormonal response, and suppose that the next investigations will give a new insights in the molecular mechanisms of this effects and its role in the formation of the hormone-resistant phenotype of the tumors.

The work was supported by the Russian Science Foundation, grant № 16-34-01031.

References:

1. *Andreeva, O.E., Shcherbakov, A.M., Shatskaia, V.A., and Krasil'nikov, M.A. [The role of transcription factor Snail1 in the regulation of hormonal sensitivity of in vitro cultured breast cancer cells] // Voprosy onkologii.– 2012.-Vol. 58, № 1 - P.71-76.*
2. *Harris, D.A., Patel, S.H., Gucek, M., et al. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement // PloS one.– 2015.-Vol. 10, № 3 - P.e0117495.*
3. *Kim, M.R., Choi, H.K., Cho, K.B., et al. Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells // Cancer science.– 2009.-Vol. 100, № 10 - P.1834-1841.*
4. *Lopes-Rodrigues, V., Di Luca, A., Sousa, D., et al. Multidrug resistant tumour cells shed more microvesicle-like EVs and less exosomes than their drug-sensitive counterpart cells // Biochimica et biophysica acta.– 2016.-Vol. 1860, № 3 - P.618-627.*
5. *Lv, M.M., Zhu, X.Y., Chen, W.X., et al. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein // Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.– 2014.-Vol. 35, № 11 - P.10773-10779.*
6. *Raposo, G., and Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends // The Journal of cell biology.– 2013.-Vol. 200, № 4 - P.373-383.*
7. *Scherbakov, A.M., Andreeva, O.E., Shatskaya, V.A., and Krasil'nikov, M.A. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells // Journal of cellular biochemistry.– 2012.-Vol. 113, № 6 - P.2147-2155.*

УДК 576.54

ОЦЕНКА ВКЛАДА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ, ОПОСРЕДУЕМЫЕ СЕКРЕТОМОМ ЭТИХ КЛЕТОК

Сагарадзе Г.Д.[1], Ефименко А.Ю.[2], Агеева Л.В. [1], Калинина Н.И.[1], Басалова Н.А.[3], Нимирицкий П.П.[1], Внукова А.А.[4], Макаревич О.А.[1], Ткачук В.А.[1,2].

[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и молекулярной медицины, Москва, Россия.
[2] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Москва, Россия.
[3] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра цитологии и гистологии, Москва, Россия.
[4] ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия.
e-mail: georgy.sagaradze@gmail.com.

В работе проведена оценка вклада внеклеточных везикул в паракринные эффекты МСК жировой ткани на клеточных моделях ангиогенеза, нейритогенеза и заживления ран.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, внеклеточные везикулы, регенеративная медицина.

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) жировой ткани представляют собой многообещающий для применения в клеточной терапии и регенеративной медицине источник мультипотентных стволовых и прогениторных клеток. Эффективность применения МСК в регенеративной медицине подтверждена результатами экспериментальных и клинических исследований. Важным механизмом, обеспечивающим регенеративные эффекты МСК, является секреция данными клетками факторов роста, цитокинов, белков внеклеточного матрикса, а также внеклеточных везикул (ВВ). Кондиционированная среда, содержащая биоактивные компоненты, секретируемые МСК, демонстрирует сравнимую с клеточной терапией стимуляцию регенераторных процессов на различных клинических моделях, при этом являясь более безопасным, чем клетки, продуктом. Согласно современным данным, наибольшим терапевтическим потенциалом среди компонентов секретома МСК обладают ВВ, которые несут в своем составе специфический набор белков, биоактивных липидов, нуклеиновых кислот, защищенных билипидной мембраной. Они могут поглощаться клетками-мишенями и оказывать стойкий регенеративный эффект. Однако, во многих исследованиях показана важная роль и других компонентов, секретируемых МСК, в реализации действия этих клеток. Для понимания механизмов участия МСК в регенерации актуальна оценка вклада ВВ в регенеративные эффекты, опосредуемые секретомом МСК.

Мы выделяли ВВ и фракцию растворимых компонентов из кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК, методом ультрацентрифугирования. Для идентификации ВВ мы использовали иммуноблоттинг против основных маркеров ВВ, для визуализации - просвечивающую электронную микроскопию. С помощью клеточных моделей мы оценили воздействие ВВ на такие процессы, как ангиогенез, нейритогенез и заживление ран. Мы обнаружили, что ВВ МСК вносят существенный вклад в эффекты стимуляции образования капилляроподобных структур эндотелиальными клетками и формирования нейритов клетками нейробластомы. Однако, при моделировании заживления ран, опосредуемого функциями фибробластов кожи, роль ВВ МСК оказалась менее значительна. В дальнейшем идентификация наиболее активных секреторных компонентов МСК, в частности, конкретного подтипа ВВ, а также выбор оптимальных фракций для различных клеток-мишеней, позволят создать более эффективные терапевтические инструменты для стимуляции репаративных и регенеративных процессов в тканях.

UDC 576.54

MESENCHYMAL STROMAL CELL-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES' CONTRIBUTION TO THE REGENERATIVE EFFECTS PROVIDED BY THESE CELLS

G.D. Sagaradze[1], A.Yu. Efimenko[2], L.V. Ageeva[1], N.I. Kalinina[1], N.A. Basalova[3], P.P. Nimiritskiy[1], A.A. Vnukova[4], O.A. Makarevich[1], V.A. Tkachuk[1,2].

[1] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Moscow, Russia.
[2] Lomonosov Moscow State University, Institute of Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Moscow, Russia.
[3] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Cytology and Histology, Moscow, Russia.
[4] I.M. Sechenov's First Moscow State Medical University, Moscow, Russia.
e-mail: georgy.sagaradze@gmail.com.

We estimated the contribution of extracellular vesicles to paracrine effects of adipose-derived MSC by the use of angiogenesis, neuritogenesis, and wound healing cellular models.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, extracellular vesicles, regenerative medicine.

Regenerative medicine is a fast-growing multidisciplinary field aiming at the regeneration or replacement of damaged cells, tissues or organs. Adult mesenchymal stem/stromal cells (MSC) are often used as critical therapeutic components in regenerative medicine. MSC implement their function mainly by secreting growth factors, cytokines, extracellular matrix proteins, as well as extracellular vesicles (EV). Conditioned medium containing MSC-secreted components stimulates regenerative processes comparable with MSC themselves in various clinical models. Furthermore, therapeutic application of conditioned medium is safer than cell therapy. By present data, EV are considered to be the most potent components in MSC secretome. EV carry specific set of proteins, bioactive lipids, nucleic acids, protected by a lipid bilayer, and demonstrate persistent regenerative effects after absorption by target cells. However, many investigators show, that conditioned medium components, other than EV, also mediate MSC function. Thus, it is important to estimate the contribution of EV to the regenerative effects provided by MSC.

We isolated EV and a fraction of soluble components from MSC conditioned medium using the ultracentrifugation method. To visualize EV and to identify major EV markers we performed transmission electron microscopy and western blotting, respectively. We estimated regenerative effects of EV in such processes as angiogenesis, neuritogenesis, and wound healing. We found that impact of EV in the stimulation of endothelial cell capillary-like structure formation and neuroblastoma cell line neuritogenesis was substantial. However, EV stimulated functions of dermal fibroblasts in a wound healing models less significantly. Identification of the most promising components secreted by MSC, particularly EV subtypes, and selection of distinct conditioned medium fractions affecting different cell types will allow to produce more efficient therapeutic formulations for stimulation of regeneration and reparation in the future.

УДК 616.24-006.6:577.21

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ микроРНК КРОВИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО: ПОИСК МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

Запорожченко И.А.[1,2], Морозкин Е.С.[1,2], Рыкова Е.Ю.[1,3], Скворцова Т.Э.[1], Пономарева А.А.[4,5], Пашковская О.А.[2], Добродеев А.Ю.[4], Завьялов А.А.[4], Тузиков С.А.[4], Власов В.В.[1], Чердынцева Н.В.[4,6], Лактионов П.П.[1,2]

[1] Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8
rykova.elena.2014@gmail.com, rykova_elena_2010@mail.ru
[2] НИИ патологии кровообращения им. Академика Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, Россия;
[3]НГТУ, г. Новосибирск;
[4] Томский НИИ онкологии, г. Томск;

[5] *ТПУ, г. Томск;*
[6] *ТГУ, г. Томск; Россия*

Поиск эффективных микроРНК-маркеров рака легкого (РЛ), циркулирующих в плазме крови, проводили с использованием двух подходов: 1) верификация данных о микроРНК, которые меняют экспрессию в опухолях легкого на образцах плазмы крови; 2) выявление новых маркеров РЛ путем профилирования 179-ти микроРНК на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR (Exiqon, Дания) в образцах плазмы здоровых доноров и больных РЛ.

Ключевые слова: рак легкого, диагностика, плазма крови, циркулирующие микроРНК, количественная ОТ-ПЦР.

Разработка методов ранней диагностики рака легкого (РЛ) на основе анализа молекулярных маркеров в крови необходима для повышения эффективности терапии и снижения смертности от РЛ. МикроРНК с функциями онкогенов или онкосупрессоров были обнаружены в опухолевых клетках и плазме крови больных РЛ, что делает их перспективными онкомаркерами. В настоящей работе поиск эффективных маркеров РЛ, циркулирующих в плазме крови проводили с использованием двух подходов. Первый подход основан на верификации ранее полученных данных о микроРНК, которые меняют экспрессию в опухолевых клетках при РЛ. На основании мета-анализа информации, опубликованной в базах данных, были выбраны кандидатные микроРНК и получены новые данные об экспрессии 7-ми микроРНК (miR-19b, miR-21, miR-25, miR-205, miR-125b, miR-183, miR-126) (относительно референсной miR-16) в плазме крови больных раком легкого (n=75) и здоровых доноров (n=50) с учетом клинико-патологических характеристик больных раком легкого. Установлено, что miR-19b является значимым маркером для двух гистологических типов немелкоклеточного рака легкого: плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого (ПКРЛ и АКЛ). Снижение уровня miR-183 в плазме крови является значимым маркером для дифференцировки больных АКЛ относительно здоровых доноров. Увеличение уровня miR-126, miR-25, miR-205 наблюдалось только у больных ПКРЛ. Диагностическая чувствительность и специфичность панели из 2-х (miR-19b и miR-183) для РЛ составила 93% и 94%. Установлено, что изменение отношения экспрессии для пары микроРНК miR-125b / miR-19b в плазме крови больных раком легкого ассоциировано с высоким ответом опухоли на 2 курса неоадъювантной химиотерапии в процессе комбинированного лечения. Выявлена ассоциация miR-19b, miR-21, miR-25, miR-205 и отношения miR-125b / miR-19b с общей 5-летней выживаемостью больных по методу Каплана-Майера. Второй подход основан на масштабном поиске дифференциально экспрессированных микроРНК в плазме крови больных РЛ и здоровых доноров. Для выявления новых маркеров РЛ проведено профилирование 179-ти микроРНК на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR в образцах циркРНК здоровых доноров (n=10) и больных РЛ (n=20). Проведен статистический анализ данных профилирования при помощи пакетов функций языка R (версия 3.2.2) в оболочке R Studio, который позволил определить 29 пар микроРНК, отношение экспрессии которых в плазме крови является потенциально значимым для диагностики рака легкого. Для верификации на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Serum/Plasma (Exiqon, Дания) выявленных отношений экспрессии в парах микроРНК проведен анализ выбранной панели 20-ти микроРНК на независимой выборке больных РЛ (n=30), больных эндобронхитом (n=10) и здоровых доноров (n=20). Статистический анализ полученных данных позволил определить пары микроРНК, достоверно изменяющие отношение экспрессии в плазме крови больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами и больными эндобронхитом. Полученные результаты важны для понимания процессов формирования пула циркулирующих микроРНК при онкологических процессах легкого, для создания «молекулярного портрета» опухолей легкого с целью их дифференциальной диагностики и лечения. Планируется верификация выявленных маркеров при помощи методов масштабного исследования и количественной ОТ-ПЦР на более представительных группах пациентов.

Работа поддержана грантом РФФИ №14-04-01881.

UDC 616.24-006.6:577.21

CIRCULATING microRNA IN LUNG CANCER: DEVELOPMENT OF MARKERS APPLICABLE FOR DIAGNOSTICS AND THERAPY EFFECT EVALUATION

Zaporozhchenko I.A.[1,2], Morozkin E.S.[1,2], Rykova E.Y.[1,3], Skvortsova T.E.[1], Ponomaryova A.A.[4,5], Pashkovskaya O.A.[2], Dobrodeev A.Y.[4], Zav'yalov A.A.[4], Tuzikov S.A.[4], Vlassov V.V.[1], Cherdyntseva N.V.[4,6], Laktionov P.P.[1,2]

[1] Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Prospect of Academician Lavrentyev, 8
e-mail: rykova.elena.2014@gmail.com, rykova_elena_2010@mail.ru
[2] Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology Academician E.N. Meshalkin, Novosibirsk; [3]Novosibirsk State Technical University; [4]Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk; [5]National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk; [5]National Research Tomsk State University, Tomsk

Development of micro-RNA-based lung cancer markers in the blood plasma was carried out using two strategies: 1) microRNA earlier known to change expression in lung tumor tissues were tested in blood plasma by RT-PCR; 2) novel putative lung cancer markers were selected by comparative profiling of 179 microRNA in plasma samples of LC patients and controls using miRCURY LNA miRNA qPCR platform (Exiqon, Denmark).

Key words: lung cancer, diagnostics, blood plasma, circulating microRNA, quantitative RT-PCR.

Development of early lung cancer (LC) diagnostics based on molecular markers circulating in the blood is critical for therapy improvement and mortality decrease. MicroRNAs were found to function as oncogenes and oncosuppressors in tumor cells, their presence in LC patient blood suppose them as valuable cancer markers. We used two approaches in order to find reliable circulating microRNA markers. First approach was based on the verification of microRNAs shown earlier to change their expression in association with lung malignant transformation. Meta-analysis of database information allowed selection of 7 MicroRNAs (miR-19b, miR-21, miR-25, miR-205, miR-125b, miR-183, miR-126) which expression (relative to miR-16 reference) was studied in the blood plasma from LC patients (n=75) and healthy donors (n=50). Results were analyzed in association with clinical and demographical characteristics. MiR-19b was shown to be a valuable marker for lung squamous cell carcinoma (SCC) as well as adenocarcinoma (AK). Decrease of miR-183 level in the blood plasma was a valuable marker for AK discrimination from healthy donors. MiR-126, miR-25, miR-205 demonstrated an increased level in SCC patients. Combination of miR-19b и miR-183 markers allowed lung cancer diagnostics with 93% sensitivity and 94% specificity. MiR-125b / miR-19b ratio was found to be significantly changed in the blood plasma of lung cancer patients in association with a tumor response for 2 courses of neoadjuvant chemotherapy. The Kaplan-Meier survival curves showed an association of miR-19b, miR-21, miR-25, miR-205 and miR-125b / miR-19b ratio with the 5-year survival of patients treated with a combined therapy. Second approach was based on the high throughput search for the circulating microRNAs which change their level in lung cancer patients compared with healthy subjects. Profiling of 179 microRNAs was made using the miRCURY LNA miRNA qPCR platform (Exiqon, Denmark) in the plasma samples of healthy donors (n=10) and lung cancer patients (n=20). Profiling data were analyzed using statistic packages (v. 3.2.2) in the R programming language in the R Studio which allowed find 29 candidate miRNA pairs potentially significant for lung cancer diagnostics. Verification was made using the same miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Serum/Plasma for 20 miRNAs in the independent groups of samples from LC patients (n=30), patients with endobronchitis (n=10), and healthy donors (n=20). Statistical analysis revealed miRNA pairs which expression ratio was significantly changed in the blood plasma from lung cancer patients compared with group of healthy subjects and patients with endobronchitis. The data obtained highlight the process of circulating miRNA pool formation and are important for the lung cancer "molecular portrait" development which provides new diagnostic markers and therapeutic targets. Further verification of the candidate miRNA markers using high throughput techniques and quantitative RT-PCR should be made.

Study has been supported by Russian Foundation for Basic Research (RFBR, grant No. 14-04-01881).

УДК 577.218: 616.65-002-006: 616-07

МИКРОВЕЗИКУЛЫ И МИКРОРНК МИКРОВЕЗИКУЛ МОЧИ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О.Е. Брызгунова[1,2], Е.А. Лехнов[1,2], И.А. Запорожченко[1,2], Т.Е. Скворцова[1], Е.С.Морозкин[1,2], А.Е., Григорьева[1], Е.И. Рябчикова[1], В.В. Власов[1], П.П. Лактионов[1,2]

[1] Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, г. Новосибирск,
[2] Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения академика Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск
630090, Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 8
e-mail: ivanzap@niboch.nsc.ru

Исследован размер, экспрессия поверхностных маркеров и состав микровезикул мочи здоровых доноров и больных РПЖ. Показано, что основная часть частиц имеет размер менее 100 нм, экспрессирует CD9, CD24 и CD63 и по этим признакам микрочастицы исследуемых групп не отличаются. Анализ микроРНК из фракции микровезикул мочи позволяет диагностировать больных РПЖ с чувствительностью/специфичностью 93%/100%

Ключевые слова: рак предстательной железы, микроРНК, микровезикулы, экзосомы, моча, ранняя диагностика

Конфликтная ситуация в области ранней диагностики рака предстательной железы (РПЖ), возникшая из-за расхождения рекомендаций Специальной комиссией по медицинской службе США (USPSTF) и результатов исследований PLCO и EPSPC, демонстрирует востребованность эффективных скрининговых тестов на рак предстательной железы. Новые «умные» стратегии диагностики и мониторинга лечения, такие как PROGENSA™PCA3, 4Kscore и PHI, пока не завоевали однозначного признания. Исследования последних лет показали, что подходы, основанные на анализе микрочастиц и микроРНК, могут быть эффективно использованы для диагностики онкологических заболеваний. Целью настоящего исследования являлось изучение микрочастиц мочи и микроРНК мочи, упакованных в нуклеопротеиновые комплексы и в микрочастицы мочи.

Для выделения микровезикул и экзосом мочи использовали протокол основанный на ультрацентрифугировании и отборе частиц по размеру при помощи фильтрации через микропористые фильтры. Для изучения свободных микроРНК мочи и микроРНК из фракций микровезикул были использованы ранее разработанные протоколы выделения микроРНК [1,2].

При помощи этих методов выделены и охарактеризованы суммарные микрочастицы и экзосомы мочи здоровых доноров и больных раком предстательной железы. Основную часть частиц в обеих фракциях составляли частицы размеров менее 100 нм, содержащие экзосомальные маркеры CD9, CD24 и CD63. В полученных препаратах было определено содержание белка, тотальной РНК и ДНК. С частицами было связано 0,6% общего белка мочи, при этом частицы размером более 100 нм были более богаты белком. Концентрация ДНК в препаратах суммарных частиц и экзосом составила 18 и 2,8 пг/мл, соответственно, а концентрация тотальной РНК – не более 290 пг/мл исходного объема мочи.

При помощи количественной ОТ-ПЦР в препаратах микроРНК, выделенной из осветленной мочи и фракций микровезикул была измерена концентрация четырех маркерных микроРНК - miR-19b, miR-25, miR-125b, miR-205 и одной контрольной микроРНК – miR-16. Экспрессия miR-19b и miR-125b в препаратах суммарных микрочастиц достоверно отличалась между группами ($P<0,0001$ и $P=0,0150$, соответственно), при этом точность разделения групп на основе концентрации miR-19b составляла 97% (чувствительность/специфичность 93%/100%) [3]. Данные корреляционного анализа позволяют предположить, что источником таких различий служит перераспределение микроРНК между свободной и связанной с частицами формами, причем это перераспределение ассоциировано с развитием онкологического процесса.

Для повышения устойчивости диагностической системы и выбора оптимального источника микроРНК, было выполнено профилирование микроРНК на платформе miRCURY LNA PCR (Exiqon, Дания). Панель включала 89 микроРНК, из которых 54 взяты из miRCURY LNA PCR Exosome Panel, а 35 выбраны на основе анализа доступной литературы и баз данных. При помощи разработанной панели получены профили экспрессии микроРНК, выделенной из осветленной мочи и препаратов микрочастиц здоровых доноров, пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и РПЖ, и выбраны кан-

дидатные микроРНК для верификации при помощи количественной ОТ-ПЦР.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-00124

Литература:

1. *Lekchnov E. A., Zaporozhchenko I. A., Morozkin E. S., Bryzgunova O. E., Vlassov V. V., Laktionov P. P. Protocol for miRNA isolation from biofluids//Analytical Biochemistry. 2016. Vol. 499. № 15. P. 78-84.*
2. *Zaporozhchenko I. A., Morozkin E. S., Skvortsova T. E., Bryzgunova O. E., Bondar A. A., Loseva E. M., Vlassov V. V., Laktionov P. P. A Phenol-Free Method for Isolation of microRNA from Biological Fluids//Anal Biochem. 2015. Vol. 479. P. 43-47.*
3. *Bryzgunova O. E., Zaripov M. M., Skvortsova T. E., Lekchnov E. A., Grigor'eva A. E., Zaporozhchenko I. A., Morozkin E. S., Ryabchikova E. I., Yurchenko Y. B., Voitsitskiy V. E., Laktionov P. P. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients//PLoS One. 2016. Vol. 11. № 6. P. e0157566.*

УДК 577.218: 616.65-002-006: 616-07

URINE MICROVESICLES AND MICROVESICLE-ASSOCIATED MIRNAS IN PROSTATE CANCER DIAGNOSTICS

O. E. Bryzgunova[1,2], E.A. Lekchnov[1,2], I.A. Zaporozhchenko[1,2], T. E. Skvortsova[1], E.S. Morozkin[1,2], A.E. Grigor'eva[1], E.I. Ryabchikova[1], V.V. Vlassov[1], P.P. Laktionov[1,2]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, [2]Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology of academician E.N. Meshalkin, Novosibirsk
630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave. 8
e-mail: ivanzap@niboch.nsc.ru

Size distribution, surface markers and contents of urine microvesicles from healthy individuals and prostate cancer patients were investigated. The majority of vesicles are below 100 nm, carry CD9, CD24 и CD63 tetraspanins, and show no differences between the groups. Analysis of microvesicle-associated miRNAs allows detection of prostate cancer patients with 93%/100% - sensitivity/specificity.

Key words: prostate cancer, miRNA, microvesicles, exosomes, urine, early diagnostics

Controversy regarding early diagnostics of prostate cancer resulting from the disagreement between US Preventive Services Task Force recommendations and the outcomes of PLCO and EPSPC trials illustrates the demand in novel approaches for prostate cancer screening. New intelligent strategies for diagnostics and monitoring of therapy effectiveness, such as PROGENSA™PCA3, 4Kscore and PHI have yet to gain universal acclaim. Recent studies have suggested that examination of extracellular vesicles and miRNAs can yield new candidates for cancer biomarkers. In this study, we have focused on urine miRNAs found in nucleoprotein complexes or located inside of extracellular vesicles present in urine.

Extracellular vesicles, including exosomes, were isolated from urine with ultra-centrifugation followed by size-selection by filtration through 0.1 μm pore filter. Preparations of miRNAs were obtained using two original isolation protocols reported earlier [1,2].

Preparations of total extracellular vesicles and exosomes were obtained from urine of healthy individuals and prostate cancer patients. The majority of vesicles in both factions were smaller than 100 nm and contained CD9, CD24 and CD63 surface markers. Protein, DNA and RNA content of extracellular vesicles were assessed. Urine vesicles carry approximately 0,6% of total urine protein, and larger vesicles are enriched in protein content compared with smaller ones. DNA concentration in preparations of total extracellular vesicles and exosomes was 18 and 2,8 pg/ml, while RNA concentration amounted to less than 290 pg per ml of starting urine volume.

Relative expression of four miRNAs - miR-19b, miR-25, miR-125b, miR-205 – was measured by quantitative RT-PCR against control miR-16 [3]. Significant differences in expression of miR-19b and miR-125b in preparations of total extracellular vesicles were found (P<0,0001 and P=0,0150 respectively). These differences could distinguish between healthy and cancer groups with 97% accuracy (93%/100% - sensitivity/specificity). Correlation analysis of miRNA concentrations in different fractions of urine suggests that a re-distribution of miRNAs between vesicles and vesicle-free form occurs as a result of cancer development.

To enhance the stability of diagnostic system and select optimal source of miRNAs, profiling was performed using a 89 miRNA miRCURY LNA PCR panel constructed from 54 miRNAs originating from pre-made miRCURY LNA PCR Exosome Panel supplemented by additional 35 miRNAs selected after an extensive analysis of recent

publications and databases. Using the panel, miRNAs were profiled in urine extracellular vesicles and clarified urine, and from the obtained data candidate miRNA biomarkers for prostate cancer were selected for further verification by quantitative RT-PCR.

This work was supported by the Russian Science Foundation (No: 16-15-00124).

References:
1. *Lekchnov E. A., Zaporozhchenko I. A., Morozkin E. S., Bryzgunova O. E., Vlassov V. V., Laktionov P. P. Protocol for miRNA isolation from biofluids//Analytical Biochemistry. 2016. Vol. 499. № 15. P. 78-84.*
2. *Zaporozhchenko I. A., Morozkin E. S., Skvortsova T. E., Bryzgunova O. E., Bondar A. A., Loseva E. M., Vlassov V. V., Laktionov P. P. A Phenol-Free Method for Isolation of microRNA from Biological Fluids//Anal Biochem. 2015. Vol. 479. P. 43-47.*
3. *Bryzgunova O. E., Zaripov M. M., Skvortsova T. E., Lekchnov E. A., Grigor'eva A. E., Zaporozhchenko I. A., Morozkin E. S., Ryabchikova E. I., Yurchenko Y. B., Voitsitskiy V. E., Laktionov P. P. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients//PLoS One. 2016. Vol. 11. № 6. P. e0157566.*

УДК 616.131

РОЛЬ МИКРОРНК В РАЗВИТИИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ: СВИДЕТЕЛЬ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ИЛИ ВОЗМОЖНАЯ ЦЕЛЬ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЛЕЧЕБНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА?

Затейщиков Д.А.[1,2]

[1] *ГБУЗ «Городская клиническая больница №51 ДЗМ», Москва, Россия*
121309, Москва, ул. Алябьева, 7/33
[2] *ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» УД Президента РФ, Москва, Россия*
121359, Москва, ул. Маршала Тимошенко, д. 15, к. 10
E-mail: dz@bk.ru

Дискуссионный доклад о роли микроРНК в развитии легочной артериальной гипертензии.

Ключевые слова: микроРНК; легочная артериальная гипертензия.

Лёгочная артериальная гипертензия (ЛАГ) – своеобразное квазионкологическое заболевание, в основе которого лежит врожденная или приобретенная дисфункция ангиогенеза. Хорошо известно, однако, что среди носителей определенно патологической мутации, лежащей в основе развития ЛАГ, шанс заболеть будет иметь лишь каждый пятый. Механизм такой неполной пенетрантности болезни до настоящего времени неясен. В последнее время появились основания предполагать, что одним из путей реализации этого генетического дефекта являются процессы нарушения регуляции стабильности ДНК. МикроРНК принимает участие в данных процессах и может выступать в качестве фактора, влияющего на несколько звеньев патогенеза ЛАГ. Изучение этого звена патологического процесса ЛАГ может дать инструмент для раннего выявления заболевания, профилактики его развития и лечения.

Udc 616.131

ROLE OF MICRORNA IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION PROGRESSION: A MARKER OR POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET?

Zateyshchikov D.A.[1,2]

[1] *City Clinical Hospital N51, Moscow, Russian Federation*
7/33, Alyabiev Str., 121309 Moscow, Russian Federation
[2] *Educational and Research Medical Center of Russia President General Management, Moscow, Russian Federation*
21, Marshal Timoshenko Str., 121359 Moscow, Russian Federation
E-mail: dz@bk.ru

Discussion report about the role of microRNA in pulmonary arterial hypertension progression.

Key words: microRNA; pulmonary arterial hypertension.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a specialized quasi-oncological disease caused by congenital or acquired dysfunction of angiogenesis. It is well-known, that only 1/5 of carriers of particular pathological mutation linked to PAH develop the disease. The underlying mechanism of such incomplete penetrance is not known yet. Over the last decade some evidences appeared, that one route to make this genetic defect apparent is the dysregulation of DNA stability. MicroRNAs are involved in these processes and could potentially influence several steps of PAH pathogenesis. Investigation of the molecular linkage between microRNAs and PAH pathogenesis could potentially lead to the development of early diagnostics, prevention and treatment of this disease.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 620.3

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА НАНОЭМУЛЬСИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ТАКСАНЫ, ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ

Угланова С.В.[1, 2], Привалова А.М.[3], Марквичева Е.А.[4], Зайцева Е.А.[1], Клячко Н.Л.[1]

[1] Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
[2] ИБХФ РАН имени Н.М. Эмануэля, Москва, Россия
[3] НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия
[4] Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия
119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, ГСП-1, стр. 11
e-mail: suglanova@gmail.com

Созданы и исследованы наноэмульсионные формы водонерастворимых противоопухолевых препаратов таксанов, подобраны стабилизирующие добавки, позволяющие разводить таксан-содержащую эмульсию инфузионными растворами для внутривенного введения. В экспериментах in vitro на мультиклеточных опухолевых сфероидах (МОС) показано увеличение цитотоксичности по сравнению с существующими на рынке препаратами.

Ключевые слова: наноэмульсии, таксаны, альгинат-хитозановые микрокапсулы

Противоопухолевые химиотерапевтические препараты таксаны (доцетаксел и паклитаксел) широко применяются при лечении рака молочной железы. Ввиду практически полной нерастворимости этих веществ в воде их использование в клинической практике не достаточно эффективно и требует дальнейшего совершенствования лекарственных форм. Целью настоящего исследования является создание новых нано- и микроформуляций, содержащих таксаны, способных постепенно высвобождать действующее вещество, что исключительно важно при проведении химиотерапевтического лечения с помощью внутривенного введения, а также исследование противоопухолевой активности разрабатываемых образцов наноэмульсий *in vitro*.

Нами получены таксан-содержащие наноэмульсии, способные постепенно высвобождать действующее вещество в среде, имитирующей плазму крови. Включение таксанов в состав дисперсной фазы стабилизированной наноэмульсии на основе липидов позволило увеличить их растворимость в водной среде до 10-12 мг/мл, что более, чем в 1000 раз превышает растворимость немодифицированного паклитаксела в воде. Установлено, что размеры частиц полученных систем не превышают 200 нм в жидком виде и 500 нм при лиофильном высушивании.

Подобраны стабилизирующие добавки, позволяющие разводить таксан-содержащую эмульсию в 10-20 раз инфузионными растворами, что указывает на возможность внутривенного введения.

На примере доцетаксел-содержащей наноэмульсии проведены исследования цитотоксичности на монослое и мультитклеточных опухолевых сфероидах (МОС), полученных на основе клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7). Сфероиды были получены методом микрокапсулирования внутри биосовместимых альгинат-хитозановых микрокапсул и представляют собой адекватную модель малых солидных опухолей(1). Сравнительные испытания таксан-содержащих лиофилизатов in

vitro на МОС показали увеличение эффективности действия разрабатываемого лекарственного средства в форме наноэмульсии по сравнению с доступным коммерческим препаратом.

Литература:
1. *Privalova A.M., Uglanova S.V., Kuznetsova N.R., Klyachko N.L., Golovin Y.I., Korenkov V.V., Vodovozova E.L., Markvicheva E.A. Microencapsulated Multicellular Tumor Spheroids as a Tool to Test Novel Anticancer Nanosized Drug Delivery Systems In Vitro// J. Nanosci. Nanotech, J. Nanosci. Nanotechnol, J. 2015. V. 15. P. 4806 - 4814.*

UDC 620.3

PREPARATION AND PROPERTIES OF TAXANE-CONTAINING NANOEMULSIONS FOR ANTINEOPLASTIC THERAPY

Uglanova S.V.[1, 2], Privalova A.M.[3], Markvicheva E.A.[4], Zaitseva E.A.[1], Klyachko N.L.[1]

[1] Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
[2] Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[3] National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia
[4] Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119991, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory, GSP-1, str. 11
e-mail: suglanova@gmail.com

Nanoemulsions for water insoluble anticancer drugs, taxanes, are developed and investigated. Stabilizing agents are suggested to delute taxane-containing emulsion with infusion solution for parenteral infusion. *In vitro* study on multicellular tumor spheroids (MTS) and monolayer culture demonstrated the cytotoxicity of docetaxel-loaded lyophilized nanoemulsion to be more effective in comparison with commercial dosage form.

Key words: nanoemulsion, taxanes, alginate-oligochitosan microcapsules

Antineoplastic drugs Taxanes (docetaxel and paclitaxel) are widely used for metastatic breast cancer treatment. Because of very low water solubility their clinical application effectiveness is restricted and new drug form investigations are hold on. The aim of the study was taxane-containing nano- and microformulation development, demonstrating the prolonged release for v/v introduction, and *in vitro* investigations of their antineoplastic activity.

In the current study, the stabilized lipid nanoemulsions were obtained as containers for taxanes. Thus their solubility in water medium increased more than 1000 times compared to non-modified paclitaxel water solubility. The prolongation of the drug release on a plasma model was demonstrated. Taxane-containing system particles sizes were found to be less than 200 nm for liquid emulsion and 500 nm for reconstructed from freeze dried one.

To use the most effective parenteral introduction stabilizing components were matched; the nanoemulsion was diluted with infusion solution 10-20 times and retained its properties.

Docetaxel-containing nanoemulsion cytotoxicity was tested using on multicellular tumor spheroids (MTS) and monolayer culture. MTS based on human adenocarcinoma MCF-7 cells were obtained using microencapsulation and in alginate-oligochitosan microcapsules. MTS could be considered as artificial small size tumors[1]. In this study, the cytotoxicity of docetaxel-loaded lyophilized nanoemulsion is considered to be more effective in comparison with traditionally used dosage form.

References:
1. *Privalova A.M., Uglanova S.V., Kuznetsova N.R., Klyachko N.L., Golovin Y.I., Korenkov V.V., Vodovozova E.L., Markvicheva E.A. Microencapsulated Multicellular Tumor Spheroids as a Tool to Test Novel Anticancer Nanosized Drug Delivery Systems In Vitro// J. Nanosci. Nanotech, J. Nanosci. Nanotechnol, J. 2015. V. 15. P. 4806 - 4814.*

УДК 544.77.022.533

ИЗУЧЕНИЕ ФАЗОВОГО ПОВЕДЕНИЯ ВЕЗИКУЛ DODAB С ПОМОЩЬЮ ДИНАМИЧЕСКОГО И СТАТИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА И АДИАБАТИЧЕСКОЙ КАЛОРИМЕТРИИ

Воронов В.П., Курьяков В.Н., Муратов А.Р.

Институт проблем нефти и газа РАН, Москва, Россия
119333, Москва, ул. Губкина, д.3, ИПНГ РАН
e-mail: kouryakov@ogri.ru

Методами динамического и статического рассеяния света и адиабатической калориметрией изучено фазовое поведение водного раствора DODAB в интервале температур 25-60 оС. Определены температуры фазовых переходов в везикулах DODAB.

Ключевые слова: фазовые переходы, везикулы, DODAB, доставка лекарств, динамическое и статическое рассеяние света.

Методами динамического и статического рассеяния света и адиабатической калориметрией изучено фазовое поведение водного раствора DODAB [1]. DODAB (диоктадецилдиметиламмония бромид) представляет собой синтетический липид, имеющий полярную головную группу и два хвоста, состоящих из 18 цепей. DODAB может образовывать однослойные (ULVs) и многослойные (MLV) везикулы в воде. Везикулы синтетических липидов, таких как DODAB, являются перспективным инструментом для доставки лекарственных средств. Таким образом, информация о фазовом состоянии везикул является актуальной и важной. В работе экспериментально определены четыре фазовых перехода при нагреве с температурами 35,2 °C (субгель – гель), 39,6 °C (гель – «ripple phase»), 44,6 °C (гель – жидкость), и 52,4 °C (субгель – жидкость, для MLV) при нагревании и один переход при температуре 40,4 °C (жидкость – гель) при охлаждении. Фазовые переходы субгель – гель и гель – жидкость в ULV и переход субгель – жидкость в MLV при нагревании, а также фазовый переход при охлаждении хорошо фиксируются методом рассеяния света. Методом динамического рассеяния света измерена температурная зависимость размера везикул в интервале температур 25-60 °C. Измерения методом динамического и статического рассеяние света выполнены на анализаторе размеров частиц Photocor Complex (Россия) [2]. Показано, что фазовое состояние раствора DODAB зависит не только от концентрации и температуры, но и от протокола пробоподготовки и истории температурных изменений образца.

Литература:
1. Voronov V.P., Kuryakov V.N., Muratov A.R. Phase behavior of DODAB aqueous solutions // JETP. 2012, Vol. 115, Iss. 6, P. 1105-1110.
2. Сайт компании ООО «Фотокор»: http://www.photocor.ru (дата обращения 14.01.2017)

UDC 544.77.022.533

STUDY OF PHASE TRANSITION IN DODAB VESICLES BY MEANS OF DLS, SLS AND ADIABATIC CALORIMETRY

Voronov V.P., Kuryakov V.N., Muratov A.R.

Oil and Gas Research Institute RAS, Moscow, Russia
119991, Moscow, Gubkina st. 3. OGRI RAS
kouryakov@ogri.ru

Phase behavior of DODAB aqueous solution was studied by dynamic and static light scattering and adiabatic scanning calorimetry in the temperature range 25-60 °C. Temperatures of phase transitions in DODAB vesicles were determined.

Key words: phase transitions, vesicles, DODAB, drug delivery, dynamic and static light scattering.

Phase behavior of DODAB aqueous solution was studied by dynamic and static light scattering and adiabatic scanning calorimetry [1]. DODAB – dioctadecyldimethylammonium bromide is a synthetic lipid having a polar head group and two tails consisting of 18 chains. DODAB can forms unilamellar vesicles (ULVs) and multilamellar vesicles (MLV) in water. Vesicles of synthetic lipids like DODAB is perspective regarding drug delivery. So information about phase state of vesicles is actual and important. Our measurements revealed four phase transitions with the temperatures 35,2°C (subgel–gel), 39,6°C (gel–ripple phase), 44,6°C (gel–liquid), and 52,4°C (subgel–liquid for MLV) at heating and one transition at the temperature 40,4°C (liquid–gel) at cooling. The subgel–gel and gel–liquid phase transitions in ULV and the subgel–liquid transition in MLV at heating as well as the phase transition at cooling are easily observed by light scattering measurements. By means of DLS the temperature dependence of vesicles size was measured in the temperature range 25–60 °C. Dynamic and static light scattering measurements were performed on a photon correlation spectrometer Photocor Complex (Russia) [2]. The phase state of DODAB solution reveals a strong hysteresis and depends not only on the concentration and temperature but also on the sample preparation protocol and the history of temperature variation. It follows that the phase behavior depends on the temperature range and the temperature change rate at the measurement process.

References:
1. *Voronov V.P., Kuryakov V.N., Muratov A.R. Phase behavior of DODAB aqueous solutions // JETP. 2012, Vol. 115, Iss. 6, P. 1105-1110.*
2. *Website of Photocor Instruments company: http://www.photocor.ru*

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭКЗОСОМОПОДОБНЫХ СТРУКТУР В КАЛЛУСНЫХ ТКАНЯХ ПШЕНИЦЫ

Бишимбаева Н.К., Байменов М.К., Муртазина А.С., Рахимова Е.В.

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан.
РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан.
e-mail: gen_jan@mail.ru

Исследование экстрацеллюлярных структур представляет особый интерес в связи с тем, что именно они осуществляют межклеточные взаимодействия, лежащие в основе большинства биологических процессов, и служат в качестве переносчиков сигналов и индукторов, опосредующих гормон- и стресс- индуцируемые реакции [1].

Ключевые слова: экзосомы, электронная микроскопия, каллусные ткани, пшеница, экстрацеллюлярное пространство.

Среди разнообразия везикул, высвобождаемых клетками в последнее время экзосомам уделяется особое внимание. Экзосомы определены как нано-везикулы 50-100 нм в диаметре, содержат билипидную мембрану и связанные белки, а также цитозольные компоненты, такие как месенджер РНК и микроРНК (миРНК) [1,2]. Экзосомы опосредуют связь от клетки к клетке переправляя биологически активные вещества в отдаленные клетки и могут способствовать изменениям в генах и экспрессии белка [2]. Они довольно стабильны в биологических жидкостях вследствие наличия жесткой мембраны, что помогает предотвратить их расщепление гидролитическими ферментами [3]. Экзосомы растений слабо изучены и везикуло-опосредованная связь в растительных клетках вызывает возрастающий интерес [2,3]. **В связи с этим, важное значение представляют структурные исследования межклеточного пространства растительных тканей.**

Целью данной работы является исследование ультраструктуры межклеточного пространства эмбриогенных каллусов пшеницы [4] на предмет наличия **экстрацеллюлярных соединений и структур.** Методом световой и электронной микроскопии в межклеточном пространстве эмбриогенных каллусов обнаружены тяжи экстрацеллюлярных полисахаридов и гликопротеинов. В то же время в экстрацеллюлярном пространстве выявлены не только фибриллы веществ, но и отдельные везикулы и структуры. В частности, это крупные темные липидные капли которые располагаются как между клетками, так и в толще клеточных стенок, в цитоплазме и вакуолях. Интересным и новым результатом является то, что в экстрацеллюлярном пространстве обнаружены тонкие кольцевидные везикулы и крупные светлые сферические тельца, заполненные фибриллярным веществом. Предполагается участие этих структур в межклеточных взаимодействиях эмбриогенных каллусов **и в регуляции процессов морфогенеза in vitro.**

Некоторые из структур представляют собой мультивезикулярные комплексы по морфологии сходные с экзосомальными комплексами животных клеток, описанными в межклеточном пространстве животных клеток.

Литература:
1. *Record M., Subra C., Silvente-Poirot S., Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors // Biochem Pharmacol. – 2011. – Vol. 81. – P. 1171–1182.*
2. *Mittelbrunn M., Sanchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information // Nat. ReVol. Mol. Cell. Biol. – 2012. – Vol. 13. – P. 328–335.*
3. *Regente M., Pinedo M., Elizalde M., de la Canal M. Apoplastic exosome-like vesicles: a new way of protein secretion in plants // Plant Signal BehaVol. – 2012. – Vol. 7. – P. 544–546.*
4. *Бишимбаева Н.К. Регуляция соматического эмбриогенеза и длительное поддержание тотипотентности в культуре тканей ячменя и пшеницы // Исследования, результаты. – 2007. – №4. – С. 56-60.*

REVEALING OF EXOSOME-LIKE PARTICLES IN WHEAT CALLUS TISSUES

Bishimbayeva N.K., Baimenov M.K., Murtazina A.S., Rakhimova E.V.

"Institute of Plant Biology and Biotechnology", Almaty, Kazakhstan
"Institute of Botany", Almaty, Kazakhstan
gen_jan@mail.ru

Research of extracellular structures is of a particular interest because they carry out cell-to-cell interactions that underlie the majority of biological processes, and serve as transporters of signals and inductors mediating hormone and stress-induced reactions [1]. In this regard, the structural investigations of intercellular spaces of plant tissues are very important. Among a variety of vesicles released by cells, special attention is being recently given to exosomes. Exosomes are defined as nano-vesicles of 50-100 nm in diameter and contain bilipid membrane and bound proteins, and cytosolic components, such as messengers RNAs and microRNAs (miRNA) [1,2]. Exosomes mediate communication between cells ferrying biologically active substances to distant cells and may contribute to changes in the genes and protein expression [3]. They are quite stable in biological fluids due to the presence of the rigid membrane, which helps prevent splitting by hydrolytic enzymes [2,3]. Plant exosomes are poorly studied, which cause the growing interest to the vesicles-mediated communication in plant cells.

The aim of this work was to study the ultrastructure of intercellular space of wheat embryogenic calli [4] for the subject of presence the extracellular compounds and structures. Light and electron microscopy revealed strands of polysaccharides and glycoproteins in extracellular space of embryogenic callus. At the same time, not only fibrils and substances, but also the individual vesicles and structures were identified in the extracellular space. In particular, the dark large lipid droplets which are arranged both between cells and the cell walls, in vacuoles and cytoplasm. An interesting and novel result is that thin annular vesicles and large bright spherical corpuscles filled with fibrillar material were found in the extracellular space. These structures are expected to participate in cell-cell interactions of embryogenic calli and in the regulation of morphogenetic processes *in vitro.* Some of multivesicular structures are morphologically similar with exosomal complexes of animal cells, described in the intercellular space of animal cells.

References:
1. *Record M., Subra C., Silvente-Poirot S., Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors // Biochem Pharmacol. – 2011. – Vol. 81. – P. 1171–1182.*
2. *Mittelbrunn M., Sanchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information // Nat. ReVol. Mol. Cell. Biol. – 2012. – Vol. 13. – P. 328–335.*
3. *Regente M., Pinedo M., Elizalde M., de la Canal M. Apoplastic exosome-like vesicles: a new way of protein secretion in plants // Plant Signal BehaVol. – 2012. – Vol. 7. – P. 544–546.*
4. *Bishimbayeva N.K. Regulation of somatic embryogenesis and long-term maintenance of totipotency in tissue culture of wheat and barley. // Research and results. – 2007. – №4. – P. 56-60.*

УДК 542.06 : 577.112

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ КРОВИ ДЛЯ ПОИСКА БИОМАРКЕРОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Бакакина Ю. С.[1], Тамкович С. Н.[2], Тутанов О. С.[2], Дубовская Л. В.[1], Лактионов П.П.[2]

[1] ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь
[2] ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия
220072, Минск, ул. Академическая, д. 27
e-mail: bakakinay@mail.ru

Сравнительный анализ протеомных карт экзосомальных белков больных раком молочной железы (РМЖ) и здоровых женщин позволил установить значимые различия в уровне экспрессии и наборе белков в норме и при патологии, что свидетельствует о диагностическом потенциале экзосомальных белков для поиска биомаркеров РМЖ.

Ключевые слова: экзосомы; кровь; рак молочной железы; протеомика; двумерный электрофорез.

Известно, что клетки млекопитающих, в том числе и клетки опухолей, продуцируют во внеклеточное пространство везикулярные частицы размером 30–100 нм – экзосомы. Экзосомы могут циркулировать как в плазме крови, так и будучи ассоциированными с поверхностью клеток крови. Выделение экзосом из крови онкологических больных позволяет выявить опухоль-специфические биомаркеры, а исследование протеома циркулирующих в крови экзосом позволяет охарактеризовать фенотип опухоли, состояние окружающих тканей, общий ответ на опухоль и выявить антигены для оптимизации диагностики и терапии опухоли.

Целью данной работы являлось сравнительное исследование протеома экзосом плазмы и экзосом, связанных с поверхностью клеток крови, у пациенток с РМЖ и здоровых женщин.

Экзосомы плазмы и экзосомы, связанные с поверхностью клеток крови, здоровых женщин и пациенток с первичным РМЖ люминального подтипа были получены методом фильтрации и ультрацентрифугирования. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии был охарактеризован размер везикул, а с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных коммерческих антител (Abcam, Великобритания и BD Biosciences, США) исследована экспрессия на поверхности частиц характерных для экзосом тетраспаниновых рецепторов (CD-9, CD-24 и CD-63). Для получения протеомных карт экзосом крови использовали метод двумерного электрофореза.

Было установлено, что в составе экзосом крови присутствуют белки с молекулярной массой от 10 до 250 кДа. Сравнительный анализ протеомных карт экзосом плазмы и экзосом, связанных с поверхностью клеток крови, в группах пациенток с РМЖ и здоровых женщин позволил установить значимые различия в уровне экспрессии и наборе белков между исследованными группами, демонстрируя, что экзосомальные белки могут быть использованы в качестве биомаркеров РМЖ. Выявленные отличия заключались в появлении новых дополнительных белков и изменении экспрессии присутствующих в норме белков. Причем наиболее значимые отличия были обнаружены в белковом составе экзосом, связанных с поверхностью клеток крови. Полученные данные позволяют нам предположить, что экзосомы, связанных с поверхностью клеток крови, являются более перспективным источником диагностического материала для идентификации протеомных маркеров РМЖ по сравнению с экзосомами плазмы крови.

Работа выполняется при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № М15СО-025) и Интеграционного проекта СО РАН (руководитель С.Н. Тамкович).

УДК 542.06 : 577.112

PROTEOMIC ANALYSIS OF BLOOD EXOSOMES FOR BREAST CANCER BIOMARKERS DISCOVERY

Bakakina Y. S.[1], Tamkovich S. N.[2], Tutanov O. S.[2], Dubovskaya L. V.[1], Laktionov P. P.[2]

[1] Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2] Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
220072, Academicheskaya st., 27
e-mail: bakakinay@mail.ru

The comparative analysis of the proteomic maps of the exosomes from patients with breast cancer (BC) and healthy females revealed differences in the protein composition in norm and pathology, which indicate the diagnostic capacity of exosomal proteins for breast cancer biomarkers discovery.

Key words: exosomes; blood; breast cancer; proteomics; two-dimensional electrophoresis.

It is well known that the human body cells as well as cancer cells release into the extracellular medium vesicles of 30-100 nm in diameter – exosomes. Exosomes can circulate in the blood plasma, and being associated with the surface of the blood cells. Isolation of exosomes from the blood of oncological patients allows to identify tumor-specific biomarkers and the study of proteome of exosomes circulating in the blood allows to characterize the tumor phenotype, the condition of the surrounding tissues, the general response to neoplasm and to identify antigens in order to optimize cancer diagnostics and treatment.

The aim of the study was to perform comparative proteomic analysis of the exosomes from patients with BC and healthy females.

Exosomes were isolated from blood plasma and from total blood of healthy females and patients with primary luminal breast cancer by filtration and ultracentrifugation. Size distribution of exosomes was characterized by transmission electron microscopy. The presence of exosome-specific markers was confirmed using monoclonal anti CD-9, CD-24, CD-63 antibodies (Abcam, UK and BD Biosciences, USA) by flow cytometry. Exosomal proteins were separated by two-dimensional electrophoresis.

It was shown that blood exosomes contain proteins with molecular weight from 10 to 250 kDa. The comparative analysis of the proteomic maps of blood plasma exosomes and blood cell-surface-bound exosomes from patients with BC and healthy females revealed differences in the protein composition between the study groups, which indicate the diagnostic capacity of exosomal proteins for breast cancer biomarkers discovery. Breast cancer induced the appearance of additional new proteins and changes in the expression of proteins present in norm. Moreover, the most significant differences were revealed in the protein composition of blood cell-surface-bound exosomes. The data allow us to assume that blood cell-surface-bound exosomes are the most perspective source for proteomic breast cancer biomarkers discovery as compared to blood plasma exosomes.

This research is supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant M15CO-025) and the Integration project of the Siberian Branch of RAS (head S.N. Tamkovich).

СЕКЦИЯ

ИММУННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

SECTION

IMMUNE BIOTECHNOLOGY

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 615.015.14

ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА 2В ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Губайдуллин И.И., Санникова Е.П., Ефремов Б.Д., Глазунов А.В., Честухина Г.Г., Котлова Е.К., Рябиченко В.В., Булушова Н.В., Залунин И.А., Яроцкий С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГБУ «ГосНИИгенетика»),
Москва, Россия
117545, 1-ый Дорожный проезд, д.1
e-mail: dg_kozlov@genetika.ru

На основе интерферона альфа-2b человека (IFN) разработан биомодифицированный препарат Глиферон для лечения вирусных заболеваний. Доклинические исследования показали, что продолжительность действия Глиферона относительно IFN пролонгировано в 3-4-раза и в диапазоне тердоз он является безопасным при однократном и при многократном подкожном введении и может быть рекомендован для проведения клинических исследований.

Ключевые слова: доклинические исследования; вирусные заболевания; интерферон; глиферон; пролонгированное действие.

Проведена разработка и выполнены доклинические исследования нового лекарственного препарата пролонгированного действия Глиферон для лечения вирусных заболеваний. В качестве активной фармацевтической субстанции препарат содержит высокоочищенный рекомбинантный белок Глиферон 100, который включает в свой состав молекулу зрелого стандартного интерферона альфа-2b человека (IFN), к N-концевому остатку которого в процессе биосинтеза присоединен структурно неупорядоченный полипептид $S(G_4S)_{20}$. Модифицирующий полипептид включает 101 остаток глицина и/или серина и используется для увеличения гидродинамического объема молекул Глиферона 100, необходимого для достижения эффектов подкожного депонирования и замедления скорости выведения белка из плазмы крови. Модифицированный Глиферон 100 получают в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* в виде белка, секретируемого в среду культивирования клеток. Уровень биосинтеза превышает 200 мг/л и может быть увеличен до 1 г/л. Ключевые характеристики Глиферона: специфическая активность (на моль белка) — почти равна активности IFN; продолжительность действия — в 3-4 превышает показатели IFN; себестоимость — как у IFN; способ получения — патенточистая рекомбинантная технология. ГЛФ Глиферона разработана в дозировке 3 млн. МЕ в виде лиофилизата для приготовления раствора для подкожных инъекций. Доклинические исследования включали исследования острой и хронической токсичности, зависимости глубины токсического поражения от величины примененной дозы и длительности применения, обратимости токсического действия, аллергенности, иммуногенности и канцерогенности. Исследования, проведенные на базе Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН по стандарту GLP, показали, что в диапазоне терапевтических доз Глиферон является безопасным при однократном и при многократном подкожном введении,

не обладает аллергенным и канцерогенным потенциалом, обладает сравнимой с IFN иммуногенностью и может быть рекомендован для проведения клинических исследований.

УДК 615.015.14

THE PROLONGED DRUG AGAINST VIRUS INFECTIONS BASED ON THE MODIFIED HUMAN INTERFERON α2B

Kozlov D.G., Cheperegin S.E., Gubaydullin I.I., Sannikova E.P., Efremov B.D., Glazunov A.V., Chestukhina G.G., Kotlova E.K., Ryabichenko V.V., Bulushova N.V., Zalunin I.A., Yarotsky S.V.

State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia 117545.
117545, 1-st Dorozhny proezd, 1
e-mail: dg_kozlov@genetika.ru

The prolonged drug against virus diseases, Glyferon, was derived from the modified human interferon α2b (IFN). In preclinical trials, therapeutic action of Glyferon is prolonged by a factor 3-4 as compared to the standard IFN. At therapeutic doses, Glyferon is safe when used as single or repeated subcutaneous injections and thus is desirable for clinical trials.

Key words: pre-clinical trials; virus infections; interferon; glyferon; prolonged half-life.

The prolonged drug against virus infections, Glyferon, was developed and pre-clinically tested. The main ingredient of Glyferon is the high-purity recombinant protein Glyferon-100 that contains mature human IFN with N-terminally added $S(G_4S)_{20}$ polypeptide, where S and G are serine and glycine residues (total: 101 amino acid residues). This structurally disordered polypeptide is aimed to increase the hydrodynamic volume of the Glyferon-100 molecule and to retard its elimination from subcutaneous depot and blood plasma thus extending Glyferon-100 half-life in human body.

Glyferon-100 is produced by high-efficient biosynthesis and secretion in the bakers yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The production yield is 200mg/l for the 36-39 h fermentation (1000 mg/l may be expected under optimized process conditions).

The Glyferon key characteristics are as follows: specific activity (per mole of protein) is nearly equal to that of the standard IFN; half-life is 3-4 times longer than that of the standard IFN; prime cost is equal to that of the standard IFN; the production method is based on recombinant DNA technology and covered by the RF patent.

Glyferon formulation: the single therapeutic dose is 3 millions IU (the same as for standard IFN) for subcutaneous injection. In preclinical trials, either single or multiple therapeutic Glyferon doses are safe when injected subcutaneously. Glyferon does not cause any allergic responses and shows no carcinogenic effects, and its immunogenicity is comparable to that of the standard IFN. As a result of successful preclinical trials, Glyferon is recommended for clinical trials.

УДК 544.77.022

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ФУЛЛЕРЕН С60: ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Андреев С. М., Шершакова Н. Н., Барабошкина Е. Н., Хаитов М. Р.
ФГБУ "ГНЦ "Институт иммунологии" ФМБА, Москва, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24
e-mail: sm.andreev@nrcii.ru

Получена новая водорастворимая форма фуллерена C_{60} (ВРФ) и на моделях атопического дерматита (АД) и реакции гиперчувствительности замедленного типа изучены ее противовоспалительные эффекты. Введение ВРФ оказывает существенное противоаллергическое действие, подтвержденное гистологическим и иммунологическим анализами.

Ключевые слова: фуллерен, наночастицы, аллергия, атопический дерматит, цитокины.

Водорастворимая форма фуллерена C_{60} (ВРФ) – перспективная основа для создания новых лекарственных средств для терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом, например, аллергических, в том числе АД. Кристаллический фуллерен совершенно нерастворим в водных средах и известные методы его водной солюбилизации связаны с интенсивной ультразвуковой обработкой эмульсии вода/толуол/C_{60}. Нами был разработан мягкий, более биосовместимый способ получения стабильного водного раствора фуллерена C_{60}, основанный на диафильтрации раствора фуллерена в смеси вода–N-метилпирролидон (МП) в присутствии аминокислотного стабилизатора [1]. Метод основан на том, что все низкомолекулярные вещества удаляются через поры мембраны, а наноразмерные кластеры фуллерена (60–80 нм) удерживаются в растворе. Эффективность трансформации C_{60} из кристаллического состояния в раствор приближается к количественной. В ходе исследований структуры наночастиц, что фуллерен формирует комплекс с молекулой МП и подвергается частичному гидроксилированию. Эти процессы, очевидно, протекают в поверхностном слое частиц, что повышает их гидрофильность, способствуя образованию оболочек из молекул воды. Добавление в среду неионного полимера, плуроника, обеспечивает стабилизацию частиц фуллерена в условиях солевой (физиологической) среды. Противовоспалительный эффект ВРФ был изучен на мышиных моделях гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и атопического дерматита (АД) [2]. Внутривенное введение ВРФ (2 мкг C_{60}/мышь) заметно снижало степень индуцированного ГЗТ-воспаления. Показано, что в присутствии ВРФ происходит существенное снижение уровня IL-4, IL-5 и IL-17 по сравнению с ГЗТ-контролем. Для создания модели АД мыши BALB/c были сенсибилизированы овальбумином путем накожной аппликации. ВРФ вызывал снижение аллергического воспаления как при накожном (1 мг/кг), так и при подкожном (0.1 мг/кг) введении. Значительное подавление продукции IgE-антител, Th2 цитокинов и сопутствующий рост продукции Th1 цитокинов, экспрессии генов Foxp3 и филагрина наблюдались у животных, получавших ВРФ. Гистологический анализ показывал, что наибольший терапевтический эффект ВРФ достигается при накожной аппликации. Мы предполагаем, что ВРФ способен сдвигать иммунный ответ в сторону Th1 и, в некоторой степени, восстанавливать функцию кожного барьера. Таким образом, препараты на основе ВРФ могут стать перспективным терапевтическим подходом для лечения аллергических и других воспалительных заболеваний.

Литература:

1. *Андреев С.М., Пургина Д.Д., Башкатова Е.Н., Гаршев А.В., Маерле А.В., Хаитов М.Р. Эффективный способ получения водных нанодисперсий фуллерена С60// Российские нанотехнологии. – 2014. – №7-8. – С.11-17.*
2. *Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshnikov O., et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis// J. Nanobiotech. – 2016. – № 14. – С.1483-1493.*

UDC 544.77.022

WATER-SOLUBLE FULLERENE C_{60}: PREPARATION AND IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES

Andreev S.M., Shershakova N.N., Baraboshkina E.N., Khaitov M.R.
NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye sh. 24
e-mail: sm.andreev@nrcii.ru

A new water-soluble form of the C_{60} fullerene (WSF) was developed. Anti-inflammatory effects of WSF were evaluated in the mouse models of atopic dermatitis (AD) and delayed-type hypersensitivity (DTH). The WSF exhibits a significant anti-allergic effect and restores to some extent the function of the skin barrier confirmed by the histological and immunological data.

Key words: fullerenes, nanoparticles, allergy, atopic dermatitis, cytokines.

The water-soluble form of the fullerene C_{60} (WSF) is a promising basis for the development of new drugs for the treatment of diseases associated with oxidative stress, including allergy diseases as AD. The crystalline fullerene is completely insoluble in aqueous media and known methods of its solubilization are associated with intense sonication of a water/toluene/C_{60} emulsions. We have developed a soft, biocompatible a method for preparing a stable aqueous C_{60} solution based the diafiltration technique of water/N-methylpyrrolidone (MP)/C_{60} mixture in the presence of amino acid stabilizers [1]. All small molecules present in the dialysate are removed through membrane pores, while the nanosized C_{60} clusters (60-80 nm) are retain. The efficiency of C_{60} conversion from the crystalline

state in solution is close to the quantitative. We established that the fullerene molecule forms a complex with MP and undergoes partial hydroxylation. The process obviously occurs in the surface layer of the particles, making them more hydrophilic, and therefore evidently WSF nanoparticles are surrounded by a shell of water molecules. Stabilization of the fullerene particles in a saline environment (physiological) is provided by introducing a non-ionic polymers, poloxamers (as F-127). WRF inflammatory effects were studied in a mouse model of delayed type hypersensitivity (DTH) and atopic dermatitis (AD) [2]. Intravenous WSF injections (2 μg C_{60}) significantly reduced the degree of DTH inflammation induced in mice. The WRF administration resulted in significant reduction of IL-4, IL-5 and IL-17 levels compared with the DTH control. To induce skin inflammation (AD model), female BALB/c mice were EC sensitized with ovalbumin by epicutaneous application. Significant suppression of IgE and Th2 cytokines production and a concomitant rise in

levels of Th1 cytokines were observed in WSF-treated groups at subcutaneous (SC) and epicutaneous (EC) administration. In addition, a significant increase of Foxp3+ and filaggrin mRNA expression was observed at EC application. Histological examination of skin samples indicated that therapeutic effect was achieved by both EC and SC treatment, but it was more effective with EC. We assume that WSF is able to shift the immune response towards Th1, and to some extent, restore the skin barrier function. Thus, WSF-based drugs may be promising therapeutic approach to treat allergic and other inflammatory diseases.

References

1. *Andreev S.M., Purgina D.D., Bashkatova E.N., Garshev A.V., Maerle A.V., Khaitov M.R. Facile preparation of aqueous fullerene C60 nanodispersions. Nanotechnol. Russ., 2014, 9(7–8):369–379.*
2. *Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshnikov O., Nikonova A., Khaitov M. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. J. Nanobiotech., 2016, 14:1483-1493.*

УДК 57.083.3: 616-002.5

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ СЕРОДИАГНОСТИКА: АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Сотников Д.В., 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

Предложена новая математическая модель определения антител (серодиагностики) методом иммунохроматографии. На основании анализа модели разработаны рекомендации по оптимизации условий определения специфических антител. Эффективность предложенных подходов продемонстрирована при диагностике легочного туберкулеза и бруцеллеза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: иммунохроматография, серодиагностика, туберкулез, бруцеллез, математическое моделирование.

Используемые в настоящее время методы диагностики инфекционных заболеваний направлены в основном на определение возбудителя заболевания и его компонентов либо на выявление иммунного ответа инфицированного организма на антигены возбудителя. К последнему типу относятся методы серодиагностики – определение специфических антител в крови. При реализации стандартного формата иммунохроматографической серодиагностики (ИХС) на мембране формируются детектируемые комплексы из иммобилизованных молекул антигена, специфических антител из пробы и конъюгата коллоидного золота с иммуноглобулин-связывающим реагентом (антивидовыми антителами или белками A/G). При этом с иммуноглобулин-связывающим реагентом взаимодействуют все иммуноглобулины пробы, а с антигеном в аналитической зоне – только специфические, составляющие менее 10% общего пула иммуноглобулинов, что в значительной степени ограничивает аналитические возможности таких тестов.

Для выявления способов преодоления ограничений существующих систем ИХС нами разработана математическая модель, описывающая процессы взаимодействия иммунореагентов в системе. Отличием предлагаемой модели является использование нечисленного подхода и учет неравновесности процессов иммунного взаимодействия, тогда как существующие модели либо являются численными, либо использу-

ют приближение равновесных условий. На основании анализа модели и выявленных факторов, лимитирующих аналитические возможности тестов, предложены новые подходы для повышения чувствительности ИХС: Расчёты демонстрируют, что для получения высокочувствительного теста следует использовать как можно более высокие концентрации реагентов для связывания антител и разбавлять пробу от 10 до 100 раз перед анализом. Также из разработанной модели следует, что более высокой чувствительностью определения специфических антител должна обладать не традиционная, а альтернативная схема ИХС, в которой коллоидное золото конъюгируется с антигеном, а в аналитической зоне сорбируется белок А, в концентрациях достаточных для связывания всех иммуноглобулинов в пробе.

Эффективность предложенных подходов продемонстрирована на примере иммунохроматографических систем для диагностики легочного туберкулеза людей с использованием рекомбинантного антигена 38 кДа *Mycobacterium tuberculosis* (Rv0934) и бруцеллеза крупного рогатого скота с использованием в качестве антигена липополисахарида *Brucella abortus*. Экспериментально показано, что разбавление пробы до 100 раз позволяет усилить сигнал до 3 раз, по сравнению с неразбавленной пробой, а использование альтернативной схемы ИХС с коллоидным золотом, конъюгированным с антигеном бактерии, позволяет повысить диагностическую чувствительность в 5 раз.

Работа проведена при поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-01131).

UDC 57.083.3: 616-002.5

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SERODIAGNOSIS: ANALYSIS OF INTERACTIONS AND METHODS FOR INCREASING THE SENSITIVITY

Sotnikov D. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B.
A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071 Moscow, Leninsky prospect 33, bld. 2
e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru

A new mathematical model of an immunochromatographic assay for the detection of specific antibodies (serodiagnosis) is proposed. On the basis of the model recommendations for optimization of detection of specific antibodies have been developed. The effectiveness of the proposed approach is demonstrated in the diagnosis of pulmonary tuberculosis and brucellosis in cattle.

Key words: immunochromatography, serodiagnosis, tuberculosis, brucellosis, mathematical modelling.

Methods currently used for diagnosis of infectious diseases focused mainly on identification of a pathogenic agent and its antigens, or detection of immune response of an infected organism to the pathogen's antigens. The latter type are serodiagnosis methods - determination of specific antibodies in the blood. In the standard format of immunochromatographic serodiagnosis (ICS) detectable complexes of the immobilized antigen molecules, specific antibodies from the sample and a conjugate of colloidal gold with immunoglobulin-binding reagent (antispecies antibodies or protein A/G) are forming on the working membrane of test-strip. All immunoglobulins in a sample will interact with the immunoglobulin-binding reagent and antigen in the analytical zone will interact only with specific immunoglobulins constituting less than 10% of the total immunoglobulins, which is greatly limits the analytical possibilities of traditional ICS.

To identify ways to overcome the limitations of existing ICS-systems we have developed a mathematical model that describes immune interactions in the systems. The advantages of the proposed model are the use of non-numerical approach and consideration of nonequilibrium conditions of the immune interactions, while existing models are either numerical or use an approximation of the equilibrium conditions. On the basis of the model the factors limiting analytical capabilities of the tests have been identified and new approaches to improve the sensitivity of the ICS have been proposed: Calculations demonstrate that using as high concentration of immunoglobulin-binding reagents as possible and dilution of a sample of 10-100 times before analysis increases the sensitivity of ICS. Also the developed model demonstrates, that higher detection sensitivity can be achieved by implementation of alternative scheme of ICA, in which colloidal gold is conjugated with the antigen and protein A at concentrations sufficient to bind all of the immunoglobulins in the sample is adsorbed in the analytical zone.

The effectiveness of the proposed approach is demonstrated on the example of immunochromatography systems for the diagnosis of humans pulmonary tuberculosis using recombinant antigen 38 kDa of *Mycobacterium tuberculosis* (Rv0934) and bovine brucellosis using lipopolysaccharide of *Brucella abortus* as antigen. It is exper-

imentally shown that the sample dilution to 100 times increases the signal up to 3 times in comparison with the undiluted sample and the use of alternative scheme of ICS with a colloidal gold conjugated with bacterial antigen improves the diagnostic sensitivity of 5 times.

The studies were supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 14-14-01131).

УДК 577.218

НОВЫЕ МОДЕЛИ, ОСНОВАННЫЕ НА ТРАНСГЕНЕЗЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ЦЕПЕЙ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА

Казанский Д. Б., Хромых Л. М., Силаева Ю. Ю., Калинина А. А., Замкова М. А., Персиянцева Н. А., Джолохава Л. Х.

ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия, 115478, Каширское шоссе, д. 24
e-mail: kazansky1@yandex.ru

Получены результаты, показывающие, что трансгенез индивидуальных цепей Т-клеточного рецептора может приводить как к формированию врожденного иммунодефицита так и к антигенспецифической стимуляции иммунного ответа.

Ключевые слова: трансплантация, противоопухолевый иммунитет, главный комплекс гистосовместимости, Т-клеточный рецептор, иммунологическая память, клонирование, аллельное исключение, иммунологический надзор.

Репертуар Т-клеточных рецепторов и особенности их структуры критически влияют на эффективность иммунологической защиты организма, включая иммунологический надзор над возникновением и ростом клонов злокачественных клеток. Одним из возможных путей направленного воздействия на репертуар Т-лимфоцитов является трансгенез индивидуальных цепей Т-клеточного рецептора на уровне зиготы. Функциональные последствия такого трансгенеза различны в связи с тем, что экспрессия α- и β-цепей в разной степени подчинена правилам аллельного исключения. Экспрессия α-цепей ими не контролируется и поэтому приводит к расширению репертуара TCR. Экспрессия β-цепей им строго подчинена, в связи с чем экспрессия трансгена β-цепи приводит к образованию репертуара рецепторов, в подавляющем большинстве которых присутствует трансгенная β-цепь, сужающая разнообразие репертуара. Ранее нами были клонированы гены β - и α-цепей TCR клеток памяти $CD8^+$, специфичных к молекуле главного комплекса гистосовместимости H-$2K^b$. В результате их внесения в геном оплодотворенной яйцеклетки нами получены трансгенные линии животных, которые могут быть использованы для моделирования взаимодействий опухолевых клеток с иммунной системой опухоленосителя. Мыши B10.D2(R101) в норме отторгают клетки лимфомы EL4 в течение 12-14 дней несмотря на то, что трансплантационные различия клеток опухоли и клеток хозяина представлены единственной молекулы гистосовместимости H-$2K^b$. В отличие от них животные, несущие трансгены β-цепи обнаруживают ослабленный иммунитет к клеткам опухоли, который приводит к их длительной персистенции в организме, сопровождающейся прогрессией, необратимой утратой опухолевыми клетками молекулы H-$2K^b$ и гибелью животных через 2-3 месяца после трансплантации им опухолевых клеток. В этой модели удается проследить все три фазы взаимодействия опухоли с иммунной системой опухоленосителя - элиминацию, равновесие и ускользание, в ходе которых опухолевые клетки под давлением иммунной системы реципиента утрачивают экспрессию молекулы H-$2K^b$ и в итоге убивают опухоленосителя. Трансгены α-цепи, напротив, ускоренно и антигенспецифически отторгают опухолевые клетки с динамикой вторичного иммунного ответа - в течение 3 дней. Способность этих клеток локализоваться в тканях и быстро уничтожать опухолевые клетки делают эту субпопуляцию наиболее вероятным носителем функций иммунологического надзора.

UC 577.218

NEW MODELS BASED ON TRANSGENESIS OF INDIVIDUAL CHAINS OF T CELL RECEPTOR

D.B. Kazansky, L.M. Khromykh, Yu.Yu. Silaeva, A.A. Kalinina, M.A. Zamkova, N.A. Persiyantseva, L.Kh. Jolokhava

Scientific Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24
e-mail: kazansky1@yandex.ru

Results obtained demonstrate capability of transgenesis of individual chains of TCR to result in formation of innate immunodeficiency as well as to antigen-specific stimulation of immune response.

Key words: transplantation, antitumor immunity, major histocompatibility complex, T cell receptor, immunological memory, cloning, allelic exclusion, immunological surveillance.

Efficiency of immunological defense including immunological surveillance is critically influenced by T cell receptor repertoire. Transgenesis of individual chains of TCR is one of possible means to manage T cell repertoire. Functional outcomes of transgenesis may be different due to diverse extent of dependence of α- and β-chains expression on the rules of allelic exclusion. Expression of transgenic α-chains results in the expansion of TCR repertoire diversity. Expression of β-chains is under strong control by allelic exclusion, resulting in formation of repertoire bearing mainly invariant transgenic β-chain pared with different α-chains and overall narrowing of repertoire. Earlier, we cloned genes encoding α- and β-chains of TCR of $CD8^+$ memory cells specific to histocompatibility molecule $H\text{-}2K^b$. After introduction them in zigotes we have obtained transgenic mouse strains, which could be used for modeling of interactions between tumor cells and immune system of recipient. Normally, B10.D2(R101) mice reject lymphoma EL4 cells in 12-14 days after transplantation, in spite of the fact, that allogeneic difference between B10.D2(R101) ($K^dI^dD^b$) mice and lymphoma EL4 (H-2b) cells is only in one product of MHC, the $H\text{-}2K^b$ molecule. Transgenics carrying β-chains of TCR displayed compromised immunity to tumor cells resulting to their long persistence, tumor progression, the loss of $H\text{-}2K^b$ molecule and death in 2-3 months after transplantation. This model allows to see all three phases of interaction between tumor and immune system of recipient - elimination, equilibrium and escape. Against, transgenics carrying α-chain antigen-specifically reject tumor cells much more quickly, as in secondary immune response, in 3 days after transplantation. The capability to be located in nonlymphoid tissue and quickly destroy tumor cells makes them to be the most probable candidate to perform immunological surveillance functions.

.....

УДК 2788.571.27

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА С ПОМОЩЬЮ БИБЛИОТЕКИ НОКАУТОВ CRISPR-CAS9

Зотова А.А., Филатов А.В., Мазуров Д.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24
e-mail: ashunaeva@gmail.com

Используя технологию CRISPR-Cas9, мы получили клеточные линии CEM и Raji/CD4 с библиотекой нокаутов. После окрашивания таких клеток антителом BF4, взаимодействующим с вирусными биопленками на поверхности клеток, инфицированных вирусом HTLV-1, негативной сортировки и секвенирования гидовой РНК (gRNA), мы идентифицировали BF4 как анти-CD82 антитело.

Ключевые слова: специфичность антигена, CRISPR-Cas9, библиотека нокаутов, моноклональное антитело, NGS

Важным этапом получения моноклональных антител является их характеристика и конечная идентификация антигена или эпитопа, с которым оно реагирует. Охарактеризовать антитело достаточно просто, если оно получено в результате иммунизации известным пептидом или белком, и гораздо сложнее, если иммунизация была проведена целыми клетками или смесью антигенов. Определение антигенной специфичности антитела еще больше усложняется, когда полученное антитело не реагирует в Вестерн-блоте и/или иммунопреципитации. Кроме основных методов идентификации антитела, основанных на белковом анализе, существует ряд дополнительных генетических подходов, таких как экспрессия кДНК и РНК-интерференция для подтверждения специфичности антитела. Ранее мы получили и описали антитело BF4, которое окрашивало вирусные биопленки на поверхности клеток, инфицированных вирусом HTLV-1, однако не идентифицировали антиген, с которым оно реагирует. В этой работе, используя недавно разработанную библиотеку нокаутов GeCKO на основе технологии CRISPR-Cas9, мы получили клеточные линии CEM и Raji/CD4 с библиотекой нокаутов. После окрашивания клеток с библиотекой антителом BF4, негативной сортировки и секвенирования гидовой РНК (gRNA), мы идентифицировали BF4 как анти-CD82 антитело. Глубокое секвенирование библиотеки GeCKO, перенесенной в клетки, показало, что шанс выделить антитело-негативные клетки и, таким образом, идентифицировать антитело зависит от качества приготовления клеток с библиотекой. Мы полагаем, что описанный метод будет пригоден для идентификации многих моноклональных гибридом, предоставляя хорошую альтернативу существующим методам оценки антител.
Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ “Поиск новых факторов рестрикции ВИЧ-1, ограничивающих репликацию вируса в условиях его межклеточной трансмиссии, путем скрининга библиотеки нокаутов GeCKO” 15-15-00135

Литература:
1. Zotova A., Zotov I., Filatov A., Mazurov D. Determining antigen specificity of a monoclonal antibody using genome-scale CRISPR-Cas9 knockout library. J Immunol Methods. 2016 Dec;439:8-14

.....

УДК 2788.571.27

DETERMINING ANTIGEN SPECIFITY OF A MONOCLONAL ANTIBODY USING GENOME-SCALE CRISPR-CAS9 KNOCKOUT LIBRARY

Zotova A., Filatov A., Mazurov D.

Laboratory of Immunochemistry, Institute of Immunology, Kashirskoe shosse 24, Moscow, Russia 115478
e-mail: ashunaeva@gmail.com

In this study, using the recently developed genome-scale CRISPR-Cas9 knockout (GeCKO) library vectors, we have established the CEM T- and the Raji B cell lines with pooled libraries. After immunofluorescent staining of these cells, negative cell sorting, and guide-RNA (gRNA) sequencing, we have identified BF4 (that specifically stains viral biofilms on the surface of HTLV-1 infected T cells) as an anti-CD82 mAb.

Key words: Antigen specificity; CRISPR/Cas9; Cell sorting; Knockout library; Monoclonal antibody.

An essential step in monoclonal antibody (mAb) development is the characterization and final identification of the specific target antigen and its epitope. Antibody validation is rather straightforward when immunization is carried out with peptide or purified protein, but is more difficult when whole cells or other complex antigens are used for the immunization. Determining antigen specificity of a mAb is further complicated, when reactivity of an antibody is not detected in Western blotting and/or immunoprecipitation assay. In addition to protein-based methods used for antibody characterization, a number of gene-based techniques, such as cDNA expression or short-interfering RNA (siRNA) knockdown have been applied for validation of antibodies with restricted reactivities. Earlier we have generated, characterized, but not identified the BF4 mAb that specifically stains viral biofilms on the surface of the Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-1) infected T cells. In this study, using the recently developed genome-scale CRISPR-Cas9 knockout (GeCKO) library vectors, we have established the CEM T- and the Raji B cell lines with pooled libraries. After immunofluorescent staining of these cells, negative cell sorting, and guide-RNA (gRNA) sequencing, we have identified BF4 as an anti-CD82 mAb. A deep sequence analysis of GeCKO library transferred to the cells shows that the chance to succeed in the selection of antibody-negative cells and, therefore, to identify a mAb depends on the quality of cell library preparation. We believe that the described method is applicable for identification of many other hybridomas and represents a good alternative to the current protein-

and gene-based methods used for mAb validation.

The project was supported by domestic grant Russian Science Foundation (RSF) 15-15-00135 “Searching new HIV-1 restriction factors affecting viral replication at cell-to-cell transmission settings via GeCKO library screening” 2015-2017.

References:
1. Zotova A., Zotov I., Filatov A., Mazurov D. Determining antigen specificity of a monoclonal antibody using genome-scale CRISPR-Cas9 knockout library. J Immunol Methods. 2016 Dec;439:8-14

УДК 616-022.7

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЛЕРОГЕННЫХ СВОЙСТВ НИЗКОЭНДОТОКСИЧНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ SHIGELLA SONNEI НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЭНДОТОКСИЧЕСКОГО ШОКА

Маркина А.А., Апарин П.Г., Львов В.Л.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия
115478, Москва, Каширское шоссе, д.24
e-mail: markinanna@mail.ru

Низкоэндотоксичные апирогенные липополисахариды *Shigella sonnei* обладают мощным толерогенным действием: предварительное введение препаратов в малых дозах защищает мышей (CBA×C57BL/6)F1 от гибели за счёт понижающей регуляции продукции ФНО-α при индукции эндотоксического шока введением 4ЛД100 эндотоксина *E.coli* O:55.

Ключевые слова: липополисахарид; *Shigella sonnei*; эндотоксический шок; эндотоксическая толерантность; ФНО-α.

Эндотоксический шок является опасным для жизни патологическим состоянием, развивающимся на фоне массивного поступления в организм эндотоксинов – липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий вследствие инфекционного процесса или серьёзных нарушений микроциркуляции. Деструктивная роль ЛПС заключается в стимуляции макрофагов через TLR4-рецепторы, что, в свою очередь, ведет к гиперпродукции провоспалительных цитокинов, прежде всего ФНО-α, пик концентрации которого в сыворотках пациентов совпадает по времени с симптомами системного воспалительного ответа [1]. Несмотря на успехи доказательной медицины и использование антибиотиков последнего поколения летальность от эндотоксического шока остается высокой и может достигать 50%, что диктует необходимость поиска новых подходов к решению этой проблемы.

Первичная умеренная активация макрофагов эндотоксином в низких дозах позволяет создать невосприимчивость к массированному (в летальной дозе) вторичному попаданию ЛПС в организм. Данный феномен получил название эндотоксической толерантности. ФНО-α является цитотоксическим маркёром эндотоксической толерантности, т.к. при повторном введении ЛПС толерогенным животным наблюдается резкое падение уровня ФНО-α [2]. Однако использование нативных ЛПС ограниченно из-за их высокой эндотоксичности. Нами впервые были получены низкоэндотоксичные апирогенные липополисахариды (НЭТ-ЛПС) из эндотоксичного штамма *Shigella sonnei*, которые являются структурными аналогами нативного пирогенного ЛПС (нЛПС) *S.sonnei* с преобладанием триацильных производных липида А и содержащие разные по длине О-полисахаридные цепи – короткие, длинные и их комбинацию.

Для исследования толерогенных свойств НЭТ-ЛПС *S.sonnei,* данные препараты, нЛПС *S.sonnei* и физ. раствор (контрольная группа) вводили внутрибрюшинно (в/б) мышам (CBA×C57BL/6)F1 в дозах 5 или 10 мг/кг за 72 часа до индукции эндотоксического шока путём в/б инъекции 100 мг/кг нЛПС *E.coli* O:55 (4ЛД100). Содержание ФНО-α в сыворотках экспериментальных (5 мг/кг НЭТ-ЛПС и нЛПС *S.sonnei*) и интактных животных (контрольная группа) определяли с помощью тест-системы Quantikine Mouse TNFα (R&D Systems, США) через 90 минут после индукции эндотоксического шока.

Все структурные варианты НЭТ-ЛПС *S.sonnei* были сравнимы по толерогенному действию с нЛПС *S. sonnei*, обеспечивая 80-100% выживаемость мышей, которая была ассоциирована с понижением продукции ФНО-α макрофагами *in vivo* до уровня ниже 300 пг/мл в ответ на в/б инъекцию 4ЛД100 нЛПС *E.coli*

O:55, что позволяет говорить об индукции эндотоксической толерантности. Все животные в контрольной группе погибли в течение первых 24 часов, а концентрация ФНО-α в сыворотках превышала 500 пг/мл.

Выраженный толерогенный противошоковый эффект различных структурных вариантов НЭТ-ЛПС *S.sonnei* позволяет рассматривать данные препараты в качестве активных компонентов толерогенной кандидат-вакцины для профилактики эндотоксического шока.

Литература:
1. *Suffredini A.F., Reda D., Banks S.M., Tropea M., Agosti J.M., Miller R. Effects of recombinant dimeric TNF-α receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration // J. Immunol. 1995. Vol. 155. P. 5038-5045*
2. *Schade F.U., Flach R., Flohe S., Majetschak M., Kreuzfelder E., Dominguez-Fernandes E., Borgermann J., Reuter M., Obertacke U. Endotoxin tolerance// Endotoxin in Health and Disease/ Editor Brade H. New York: Marcell Dekker, 1999. P. 751-767.*

УДК 616-022.7

THE INVESTIGATION OF TOLEROGENIC PROPERTIES OF *SHIGELLA SONNEI* LOW-ENDOTOXIC LIPOPOLYSACCHARIDES UNDER EXPERIMENTAL ENDOTOXIC SHOCK MODEL

Markina A.A., Aparin P.G., L'vov V.L.

National Research Center Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency (FMBA of Russia), Moscow, Russian Federation
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia
e-mail: markinanna@mail.ru

Low-endotoxic apyrogenic lipopolysaccharides of *Shigella sonnei* have a powerful tolerogenic action: pretreatment with these preparations at low doses protects (CBA×C57BL/6)F1 mice from death through downregulation of TNF-α production under endotoxic shock induced by introduction of 4LD100 of *E.coli* O:55 endotoxin.

Key words: lipopolysaccharide; *Shigella sonnei*; endotoxic shock; endotoxic tolerance; TNF-α.

Endotoxic shock is a life-threatening disease which is caused by massive ingress of gram-negative bacterial endotoxins - lipopolysaccharides (LPS) of gram-negative bacteria into bloodstream due to an infectious process or severe microcirculatory disorders. The destructive role of LPS is the stimulation of macrophage TLR4, which in turn leads to overproduction of pro-inflammatory cytokines, primarily TNF-α. The peak serum concentration of TNF-α coincides with the symptoms of a systemic inflammatory response in patients [1]. Despite significant advances in critical care and the use of antibiotics of latest-generation lethality of endotoxic shock remains high and may reach 50%, that is dictated the need to find new approaches to solving this problem.

Initial activation of macrophages by low doses of endotoxin allows create a resistance to a massive (at a lethal dose) LPS secondary challenge. This phenomenon is called early endotoxic tolerance. The TNF-α is a cytotoxic marker of endotoxin tolerance: repeated administration of LPS to tolerogenic animals causes the dramatic fall the concentration of TNF-α [2]. However, the use of LPS is limited due to its high endotoxicity. We were first obtained low-endotoxic apyrogenic LPS (LET-LPS) from endotoxic strain *Shigella sonnei*. These LET-LPS are structural analogs of native *S.sonnei* LPS (nLPS), with predominance of tri-acetylated derivatives of lipid A and with different O-polysaccharide chain length - short, long and combinations thereof.

To study tolerogenic properties of *S.sonnei* LET-LPS mice (CBA×C57B1/6)F1 were intraperitoneally (i/p) injected with sterile saline (control group), nLPS and LET-LPS of *S.sonnei* at doses of 5 or 10 mg/kg 72 h before endotoxic shock induction by i/p injection of *E.coli* O:55 nLPS at a dose of 100 mg/kg (4LD100). Concentrations of TNF-α in the sera of experimental (5 mg/kg of *S.sonnei* LET-LPS and nLPS) and intact animals (control group) were determined using Quantikine Mouse TNFα (R&D Systems, USA) test system after 90 minutes after endotoxic shock induction.

All structural variants of *S.sonnei* LET-LPS were comparable for tolerogenic action with *S.sonnei* nLPS, they provided 80-100% levels of mice survival which were associated with a reduction of TNF-α production by macrophages *in vivo* to a level below 300 pg/ml in response to i/p injection of 4LD100 of *E.coli* O:55 nLPS. Taking together these facts indicates the establishment of a state of endotoxin tolerance. All mice in control group died within 24 h after

endotoxin challenge and the level of serum TNF-α was more than 500 pg/ml.

Powerful tolerogenic anti-shock effect of different structural variants of *S.sonnei* LET-LPS allows us to consider these preparations as active ingredients of tolerogenic candidate-vaccine for the endotoxic shock prevention.

References:

1. *Suffredini A.F., Reda D., Banks S.M., Tropea M., Agosti J.M., Miller R. Effects of recombinant dimeric TNF-α receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration // J. Immunol. 1995. Vol. 155. P. 5038-5045*
2. *Schade F.U., Flach R., Flohe S., Majetschak M., Kreuzfelder E., Dominguez-Fernandes E., Borgermann J., Reuter M., Obertacke U. Endotoxin tolerance// Endotoxin in Health and Disease/ Editor Brade H. New York: Marcell Dekker, 1999. P. 751-767.*

УДК 615.371:616-022.7

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ: ПОЛУЧЕНИЕ, ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

Михайлова Н.А., Калошин А.А., Солдатенкова А.В., Зимина Е.М.

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: alex-k-1973@yandex.ru

Получены и исследованы рекомбинантные формы белка наружной мембраны F (OprF) и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*, а так же гибридный белок, представляющий их слитую последовательность, обладающие протективными свойствами. Использование комплекса OprF и анатаксина, а также гибридного белка приводило к аддитивному протективному эффекту.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, рекомбинантный антиген, белок F наружной мембраны (OprF), анатоксин, гибридный рекомбинантный белок.

Одним из основных возбудителей гнойно-воспалительных инфекций является *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка). При разработке иммунопрепаратов для борьбы с этим патогеном существенным является стимулирование иммунологических реакций против поверхностных антигенов микроорганизма и нейтрализация молекул синегнойных токсинов.

Ген, кодирующий консервативный и высокоиммуногенный белок F наружной мембраны (OprF) *P. aeruginosa*, был встроен в плазмиду pQE-30 (QIAGEN), что позволило синтезировать в клетках *Escherichia coli* рекомбинантный белок (38,9 кДа). В качестве другого протективного рекомбинантного антигена использована атоксическая форма экзотоксина А (анатоксин), поскольку он представляет собой значимый фактор патогенности *P. aeruginosa*, блокируя синтез белков в клетках млекопитающих. Последовательность, кодирующую делеционный вариант экзотоксина А с нарушенным С-концевым доменом, отвечающим за цитотоксическую функцию, встроили в плазмиду pET28b(+) (Novagen). В результате экспрессии такого гена синтезировался рекомбинантный анатоксин (65,8 кДа).

Рекомбинантные белки имели на N-конце дополнительную шести-гистидиновую последовательность, что позволило очистить их на никель-сефарозе. В иммуноблоттинге рекомбинантные белки оказались высоко специфичными. Иммунизация рекомбинантными белками и введение иммунных сывороток способствовали защите животных от экспериментальной синегнойной инфекции. Протективную активность рекомбинантных белков исследовали на мышиной модели, вводя препараты рекомбинантных белков с гидроксидом алюминия внутрибрюшинно, двукратно, с двухнедельным интервалом. После курса иммунизаций животным вводили различные дозы живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* штамма PA170015 при тестировании рекомбинантного белка OprF, либо рекомбинантный экзотоксин А *P. aeruginosa* в случае исследования рекомбинантного анатоксина.

Индекс эффективности (ИЭ) защитных свойств OprF составил 3,0 при наиболее оптимальной иммунизирующей дозе в 25 мкг. ИЭ анатоксина составил 8,9 в оптимальной иммунизирующей дозе в 50 мкг. Далее исследовали защитные свойства рекомбинантных белков против *P. aeruginosa* штамма PA-103, ха-

рактеризующегося высоким синтезом экзотоксина А. При этом использовали рекомбинантные белки, их комплекс и гибридный рекомбинантный белок (OprF-aTox), состоящий из слитых последовательностей OprF и анатоксина. Для синтеза белка OprF-aTox, ген, кодирующий белок OprF был встроен в рекомбинантную конструкцию на базе плазмиды pET28b(+) несущей ген анатоксина.

ИЭ при введении OprF и анатоксина в оптимальных дозах составлял 1,9 и 2,2. При иммунизации в оптимальных дозах комплексным препаратом белков (25 мкг OprF и 50 мкг анатоксина) и гибридным рекомбинантным белком (50 мкг) выявлено аддитивное увеличение защитных свойств (ИЭ 3,5 и 4,7).

Проведенные исследования позволяют рассматривать комплекс рекомбинантных OprF и анатоксина, а так же и их слитую форму (гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox) в качестве кандидатных вакцинных антисинегнойных препаратов.

UDC 615.371:616-022.7

RECOMBINANT ANTIGENS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA: OBTAINING, IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES, PROSPECTS.

Mihailova N.A., Kaloshin A.A., Soldatenkova A.V., Zimina E.M.
The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

The recombinant forms of the outer membrane protein F (OprF) and the toxoid of *Pseudomonas aeruginosa*, and the fusion protein (the fused sequence of the two proteins) have been obtained and studied. They had the protective properties. Using of the complex OprF and the toxoid as well as the fusion protein resulted to the additive protective effect.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, recombinant antigen, outer membrane protein F, toxoid, recombinant fusion protein.

Pseudomonas aeruginosa is one of the major pathogens of purulent-inflammatory infections. Stimulating immune responses against the surface antigen of the microorganism and the neutralization of bacterial toxin molecules is essential for development of vaccines against this pathogen.

The gene which encodes of the conserved and highly immunogenic outer membrane protein F (OprF) of *P. aeruginosa* was inserted into plasmid pQE-30 (QIAGEN). This allowed to synthesize the recombinant protein (38.9 kDa) into the cells of *Escherichia coli*. The form of the non-toxic exotoxin A (toxoid) was the another recombinant protective antigen. Exotoxin A blocks the protein synthesis in mammalian cells and represents a significant factor in the pathogenicity of *P. aeruginosa*. The sequence that encodes the deletion variant exotoxin A with the destroyed C-terminal domain, which is responsible for the cytotoxic function, was built into plasmid pET28b(+) (Novagen). As a result of the expression of the recombinant genes was the synthesized toxoid (65.8 kDa).

The recombinant proteins had had an additional six-histidine sequence at the N terminus, that allowed to purify them on the nickel-Sepharose. The recombinant proteins showed a high specificity in immunoblotting. Immunization with the recombinant proteins and the injection of immune sera provided to the protection of animals to experimental challenge with *P. aeruginosa*. The protective activity of the recombinant proteins was investigated in a murine model. The preparations of the recombinant proteins with aluminum hydroxide were injected intraperitoneally, twice, at two-week intervals. After a course of immunizations, animals were injected with various doses of a live virulent culture of *P. aeruginosa* strain RA170015 for testing the recombinant protein OprF or the recombinant exotoxin A of *P. aeruginosa* for testing the recombinant toxoid.

The efficiency index of protective properties (EI) for OprF was 3.0 at the most optimum immunizing dose of 25 μg. For the toxoid, EI was 8,9 at the most optimum immunizing dose of 50 μg. Next, we investigated the protective properties of the recombinant proteins against *P. aeruginosa* strain PA-103 which is characterized by a high synthesis of Exotoxin A. We used the recombinant proteins, their complex and recombinant fusion protein OprF-aTox which consists of fused sequences OprF and the toxoid. For synthesis of protein OprF-aTox, gene, which encodes OprF, was inserted into the recombinant plasmid pET28b(+) with the toxoid gene.

When OprF and toxoid were administered at the optimal doses, EI was 1.9 for OprF and 2.2 for the toxoid. When we immunized by the complex preparation of the proteins (25 μg OprF and toxoid 50 μg) and the recombinant fusion protein OprF-aTox, we found the additively increasing of the protective properties (EI 3,5 и 4,7).

The conducted research allow to consider the complex of the recombinant OprF and the toxoid, as well as their fused form (the recombinant fusion protein OprF-aTox) as the potential vaccines against *P. aeruginosa*.

УДК 571.12; 615.076

СОЗДАНИЕ НОВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МУРАМИЛПЕПТИДОВ

Дагиль Ю.А., Арбатский Н.П., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Мазуров Д.В., Пащенков М.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24
e-mail: dogbreeder@bk.ru

Разработана новая тест-система для оценки биологической активности мурамилпептидов, основанная на CRISPR/Cas9-опосредованном нокауте генов NOD1 и (или) NOD2 в модифицированных клетках HEK293T. Тест-система может применяться для скрининга активности мурамилпептидных лекарственных препаратов, а также для фармакокинетических исследований.

Ключевые слова: мурамилпептиды, NOD1, NOD2, CRISPR/Cas9, нокаут генов, мезодиаминопимелиновая кислота.

Мурамилпептиды – мономерные фрагменты пептидогликана бактерий, играющие важную роль в запуске врожденного иммунного ответа. Интерес к этим соединениям обусловлен, в частности, возможностью их применения в качестве иммуностимуляторов и адъювантов. Мурамилпептиды распознаются внутриклеточными рецепторами NOD1 и NOD2. «Стандартная» модель для изучения биологической активности мурамилпептидов основана на котрансфекции клеток HEK293 плазмидными векторами, обеспечивающими гиперэкспрессию NOD1 и NOD2 в сочетании с экспрессией репортерной конструкции. Мы разработали новую клеточную модель для оценки активности мурамилпептидов, основанную на экспрессии собственных генов NOD1 и NOD2 в модифицированной клеточной линии HEK293T. Специфичность активации NOD1 и NOD2 подтверждается с помощью сублиний с нокаутами генов NOD1, NOD2 или обоих.

Материалы и методы. Получена панель из 4 клеточных линий: 1) линия 293Luc, представляющая собой клетки HEK293T, в геном которых стабильно интегрирован репортерный ген люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора; 2) три сублинии 293Luc с нокаутами генов NOD1, NOD2 или обоих. Одинарный нокаут генов NOD1 или NOD2 в клетках 293Luc выполняли по технологии CRISPR/Cas9 с использованием Cas9-никазы и двух гидовых РНК на каждый ген. Клоны с нокаутом целевых генов отбирали по отсутствию ответа на специфические агонисты NOD1 и NOD2 при сохранности ответа на фактор некроза опухолей. Ответ клеток оценивали по NF-κB зависимой экспрессии люциферазы методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Нокауты подтверждали секвенированием целевых локусов. Для получения двойного нокаута клетки с нокаутом NOD1 были подвергнуты процедуре выключения гена NOD2 по аналогичной методике.

Результаты. По сравнению со «стандартной» моделью, вновь созданная тест-система обладает рядом преимуществ: 1) простота использования (отсутствует необходимость плазмидной трансфекции в каждом опыте); 2) физиологический уровень экспрессии NOD1 и NOD2; 3) отсутствие неспецифической активации NF-κB, наблюдаемой при плазмидной трансфекции. С помощью новой тест-системы показано, что рецепторы NOD1 и NOD2 имеют более широкий спектр агонистов, чем полагали ранее. В частности, NOD2 может распознавать мурамилпептиды грамотрицательных бактерий, содержащие остатки мезо-диаминопимелиновой кислоты (ранее такие мурамилпептиды рассматривались как селективные агонисты NOD1). Определены структурные особенности, определяющие агонизм мурамилпептидов по отношению к NOD1 и NOD2. Показана возможность использования вновь созданной тест-системы для исследования фармакокинетики мурамилпептидных препаратов.

УДК 571.12; 615.076

THE DEVELOPMENT OF A NOVEL CRISPR/CAS9-BASED TEST SYSTEM FOR THE ASSESSMENT OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF MURAMYL PEPTIDES

Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Mazurov D.V., Pashenkov M.V.

Federal State Budget Institution "National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency
Kashirskoe shosse 24, 115478 Moscow, Russian Federation
e-mail: dogbreeder@bk.ru

We have developed a novel test system for the assessment of biological activity of muramyl peptides. The system is based on CRISPR/Cas9-mediated knock-out of NOD1 and/or NOD2 genes in modified HEK293T cells. The system can be used for screening of activity of muramyl peptide-based drugs as well as for pharmacokinetic studies.

Key words: muramyl peptides, NOD1, NOD2, CRISPR/Cas9, gene knock-out, meso-diaminopimelic acid

Muramyl peptides are monomeric fragments of bacterial peptidoglycan, which play an important role in triggering innate immune responses. These compounds are viewed as promising immunostimulants and vaccine adjuvants. Muramyl peptides are recognized by two intracellular receptors, NOD1 and NOD2. The "standard" model used to assess biological activity of muramyl peptides is based on co-transfection of HEK293 cells by plasmid vectors that enable overexpression of NOD1 or NOD2 together with a reporter construct. We have developed a novel cellular model for the assessment of biological activity of muramyl peptides, which utilizes endogenous expression of NOD1 and NOD2 in modified HEK293T cells. The specificity of NOD1 or NOD2 activation is verified using sublines with genetic knock-outs of NOD1, NOD2 or both.

Materials and Methods. We have created a panel of 4 cell lines: (1) the 293Luc cell line, which represents HEK293T cells with a stably integrated reporter construct (a luciferase gene under an NF-κB-dependent promoter; (2) three sublines of 293Luc cells with knock-outs of NOD1, NOD2 or both. Single-gene knock-outs of NOD1 or NOD2 in 293Luc cells was performed using the CRISPR/Cas9 technology employing Cas9 nickase and two guiding RNAs per gene. Cell clones with target gene knock-ous were selected based on the absence of responses to specific NOD1 and NOD2 agonists, and unchanged response to tumor necrosis factor. The responses were assessed by NF-κB-driven luciferase expression using lucigenin-dependent chemiluminescence. Knock-outs of NOD1 and NOD2 were confirmed by sequencing target loci. To create a double NOD1/NOD2 knock-out, 293Luc subline with a single NOD1 knock-out was subjected to NOD2 knock-out as described above.

Results. In comparison to the "standard" model, the novel test-system has several advantages: (1) it is simpler to use (no need for plasmid transfection in each experiment); (2) the physiological level of NOD1 and NOD2 expression; (3) absence of non-specific NF-κB activation commonly seen after plasmid transfection. Using the novel test-system, we show that NOD1 and NOD2 receptors have a wider spectrum of agonists than previously thought. In particular, NOD2 can recognize Gram-negative muramyl peptides containing meso-diaminopimelate residues (such muramyl peptides had been viewed as selective NOD1 agonists). We delineate structural requirements defining agonism of muramyl peptides towards NOD1 and NOD2. We also show the possibility to use the novel test system to assess pharmacokinetics of muramyl peptide drugs.

УДК 577.112.37

ЭКЗОГЕННЫЕ ПЕПТИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Арапиди Г.П.[1,2], Осетрова М.С.[1,2], Савельева Т.М.[1,2], Иванова О.М.[1], Павлович П.В.[1,2], Шендер В.О.[1], Зиганшин Р.Х.[1], Аниканов Н.А.[1], Иванов В.Т.[1], Говорун В.М.[1,3]

[1] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, РФ.
[2] Московский физико-технический институт (Государственный Университет), Долгопрудный, МО, РФ.
[3] Федеральный Научно-Клинический Центр Физико-Химической Медицина ФМБА России, Москва, РФ.
117997, РФ, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10
e-mail: arapidi@gmail.com

Ключевые слова: здоровые доноры, плазма крови, микробиота человека, пептидомика, масс-спектрометрия.

Кровь, как соединительная ткань, потенциально, может содержать пептидные фрагменты любого белка организма. Среди пептидов, обнаруживаемых в крови есть как фрагменты белков, секретируемых различными тканями и выполняющими свою функцию в плазме, так и лиганды рецепторов (гормоны, цитокины, медиаторы клеточного ответа). Кроме того, в минорных количествах в крови можно обнаружить пептидные маркеры процессов, происходящих в организме (к примеру, онкомаркеры), и даже чужеродные пептиды, относящиеся к патогенам и инфекционным агентам. Изучение пептидома крови дает информацию практически о всех процессах, происходящих в организме.

Мы провели LC-MS/MS исследование образцов плазмы крови 20 практически здоровых доноров. Пробоподготовку проводили на основании ранее разработанного нами высокопроизводительного и воспроизводимого метода выделения пептидов из сыворотки и плазмы крови человека. Для идентификации использовали согласованный подход, основанный на двух поисковых машинах (Mascot и X! Tandem) и валидацию на основе машинного обучения, анализа времени хроматографического выхода пептидов и анализа спектров синтетических пептидов. Поиск проводили по базам данных известных белковых последовательностей человека, а также белков различных микробиот человека.

В результате масс-спектрометрического анализа плазмы крови здоровых доноров идентифицировано более 4000 уникальных пептидных фрагментов белков человека, и более 1000 пептидов, относящихся к микроорганизмам, входящих в состав различных микробиот человека. Большая часть идентифицированных спектров пришлась на микроорганизмы кишечной микрофлоры, а именно типы Firmicutes, Proteobacteria и Actinobacteria.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

UDC 577.112.37

EXOGENOUS PEPTIDES OF BLOOD PLASMA

Arapidi G.P.[1,2], Osetrova M.S.[1,2], Saveleva T.M.[1,2], Ivanova O.M.[1], Pavlovich P.V.[1,2], Shender V.O.[1], Ziganshin R.H.[1], Anikanov N.A.[1], Ivanov V.T.[1], Govorun V.M.[1,3]

[1] Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, GSP-7, Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow 117997, Russia.
[2] Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Institutskii Per. 9, Moscow Region, Dolgoprudny 141700, Russia.
[3] Federal Research and Clinical Center of Physico-Chemical Medicine, Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow 119435, Russia.
117997, Russian Federation, Moscow, Ulitsa Miklukho-Maklaya, 16/10
e-mail: arapidi@gmail.com

Key words: healthy donors, blood plasma, human microbiota, peptidomics, mass-spectrometry.

Blood as connective tissue may contain peptide fragments of any protein of an organism. Among peptides found in blood are protein fragments secreted by different tissues and performing their function in plasma, receptor ligands (hormones, cytokines, cell response mediators). In addition, minor amount of peptide markers of the processes occurring in the body can be detected in blood (for example, tumor markers), even foreign peptides related to pathogenic organisms and infectious agents. The study of blood peptidome can provide information about almost all processes occurring in the body.

We performed LC-MS/MS analysis of blood plasma samples of 20 healthy donors. Sample preparation was carried out based on our previously developed high effective and reproducible method of peptide extraction from human serum and plasma. We used a cooperation approach for identification, based on two search engines (Mascot, and X! Tandem) and validation based on machine learning, chromatographic retention time and analysis of synthetic peptide spectra. We searched the database of known human protein sequences, transcripts which are now referred to as long non-coding RNAs and proteins of various human microbiotas.

As a result of mass spectrometric analysis of healthy donors blood plasma we identified more than 4000 unique peptide fragments of human proteins, and more than 1000 peptides related to microorganisms belonging to different human microbiotas. Most of the identified spectra has fallen to gut microorganisms of Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria phylum.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 14-50-00131).

CRISPR/CAS9 – СИСТЕМА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ НУКЛЕОФЕКЦИИ

Гробер Н.А., Сухан Т.О., Кузнецова Е.И.

Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь
220030, г.Минск, Республика Беларусь, пр. Независимости, 4
ООО «Альгимед», Москва, Россия
121596, г. Москва, ул. Говорова 16/6

Редактирование генома позволяет внести наследуемые изменения в конкретные участки. Одним из методов внесения точечных изменений в геном является технология нуклеофекции. С помощью данного метода была исследована работа системы редактирования генома CRISPR/Cas9, определена эффективность использования нуклеофекции как одного из ключевых методов работы в данной области. Одной из областей применения системы CRISPR/Cas9 является изучение возможностей терапии при патологических состояниях человека.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, РНК-гиды, трансфекция, электропорация, нуклеофекция, патология, гемоцитобласты

CRISPR/Cas9 является системой, отвечающей за возникновение адаптивного иммунитета у бактерий и архей при проникновении бактериофагов. Компоненты системы - короткие палиндромные повторы, расположенных группами (CRISPR) и CRISPR-ассоциированный белок (Cas9), относящегося к классу эндонуклеаз. CRISPR/Cas9 использует молекулы РНК-гидов (sgRNA) для внесения модификаций в определенные участки [2].

Трансфекция – метод невирусного переноса генетического материала в клетку. Одним из методов трансфекции является электропорация, суть которой заключается в генерации электрического импульса с последующим возникновением большого количества малых пор в клеточной мембране. Нуклеофекция – метод улучшенной электропорации, отличающийся более высокой эффективностью переноса генетического материала при использовании более малых количеств переносимого субстрата. Основой высокой эффективности данного метода в сравнении с классическими методами трансфекции является создание пор как в клеточной мембране, так и в ядерной мембране [3].

Работу системы CRISPR/Cas9 как метода эффективного редактирования генома при использовании механизмов нуклеофекции можно оценить в ряде работ зарубежных исследователей. Группой исследователей из США система CRISPR/Cas9 использовалась для точечного воздействия на ген, кодирующий β-гемоглобин в гемоцитобластах [1]. Гемоглобинопатии (в частности, β – талласемия и серповидно-клеточная анемия) вызваны мутациями в гене, кодирующем β-гемоглобин. Проведенная коррекция гена в клетках гемоцитобластов пациентов с β- гемоглобинопатией позволила изучить гемоглобинопатию. Используемая исследователями система CRISPR сочетает в себе рибонуклеопротеин Cas9 и аденоассоциированный вектор для гомологичной рекомбинации в гене, кодирующем β-гемоглобин в гемоцитобластах. В ходе эксперимента использовался несколько моделей нуклеофектора, в частности, модель, обеспечившая высокоэффективную трансфекцию более 80 миллионов клеток **CD34+** гемоцитобластов. Данный эксперимент позволил исследователям оценить возможность использования систем CRISPR/Cas9 не только для изучения β- гемоглобинопатий, но и ряда других гематологических заболеваний, что позволяет сделать открытия в исследованиях в области клеточной биологии и генной терапии.

Литература:

1. *Daniel P. Dever, Rasmus O. Bak CRISPR/Cas9 β-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells doi:10.1038/nature20134*
2. *Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337 - 816-821 (2012)*
3. *Pascal G. Leclere, Aliza Panjwani, Reginald Docherty, Martin Berry, John Pizzey, David A. Tonge Effective gene delivery to adult neurons by a modified form of electroporation. Journal of Neuroscience Methods 142 (2005) - 137–143*

CRISPR/CAS9 SYSTEM OF GENOME EDITING USING NUCLEOFECTION TECHNOLOGY

Grober N.A., Suhan T.O., Kuznetsova E.I.

Belarussian State University, Minsk, Republic of Belarus
220030, Minsk, Nezavisimosti Av. 4
Algimed Ltd., Moscow, Russia
121596, Moscow, Govorova Str. 16/6

A genome editing helps enter modifications at a targeted genomic location. One of genome editing method, which helps to enter at targeted modifications in genome is nucleofection technology. CRISPR/Cas9 genome editing system was studied using this technology, checked an efficiency of nucleofection as the key method for research in this area. One of the application area if CRISPR/Cas9 is studies of possibilities in therapy of human pathological states.

Key **words:** genome editing, CRISPR/Cas9, guide RNA, transfection, electroporation, nucleofection, pathology, hemocytoblasts

CRISPR/Cas9 system is an adaptive immune response in bacteria and archaea, appears after bacteriophage invasion. A main system components are clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas9) from endonucleases. CRISPR/Cas9 uses a molecules of guide RNA (sgRNA) for enter modifications into targeted locations [2].

Transfection is non-viral method for entering a genetic material in cell. One of the transfection methods is electroporation, the main idea of which is generation of electric impulse with appearance of a lot of small pores in cell membrane. Nucleofection is improved method based on electroporation. A difference between electroporation and nucleofection is better efficiency of genome material transfer using smaller quantity of substrate in comparison with electroporation. A basis for high efficiency of this method in comparison with classical transfection methods is creating a lot of pores in cell membrane and in nuclear membrane [3].

A work of CRISPR/Cas9 system as effective method of genome editing using nucleofection technology we can see in some studies of foreign researches. Group of researchers from USA used the CRISPR/Cas9 system for target effect in HBB-gene in haematopoietic stem cells [1]. The main reason of haemoglobinopaties (β- thalassemia and drepanocytemia for example) are mutations in HBB gene. A gene correction in haematopoietic stem cells of patients with β- haemoglobinopaties helped in study of haemoglobinopaty. The CRISPR system, which was used during experiment included ribonucleoprotein Cas9 and adeno-associated viral vector for homologous recombination at the HBB gene in haematopoietic stem cells. During experiment researchers were using some types of nucleofector, particularly, large-scale nucleofector for more than 80 million of **CD34+** haematopoietic stem cells. An expression level of gene coding GFP-protein was used as marker of nucleofection efficiency for genetic construction transfer. For checking the expression levels of GFP-protein, researchers used flow cytometry method. After 15-20 days in culture the GFP-population, which expressed GFP was more than 95%. At 18-21 days after electroporation the GFP levels were found to be constant [1].

This experiment allowed researchers to evaluate possibility of use CRISPR/Cas9 not only for studying of β- haemoglobinopaties but also a number of other hematological diseases. Thereby, nucleofection in combination with CRISPR/Cas9 system is prospective technology for spreading in the field of cell biology and gene therapy.

References:

1. Daniel P. Dever, Rasmus O. Bak CRISPR/Cas9 β-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells doi:10.1038/nature20134
2. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337 - 816-821 (2012)
3. Pascal G. Leclere, Aliza Panjwani, Reginald Docherty, Martin Berry, John Pizzey, David A. Tonge Effective gene delivery to adult neurons by a modified form of electroporation. Journal of Neuroscience Methods 142 (2005) - 137–143

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 757.083.3

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МАКРОФАГОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Улитко М.В.[1,3], Ульянова А.Н.[1], Поздина В.А.[2], Белоусова А.В.[2], Булавинцева Т.С.[2], Луговец Д.В.[1,3]

[1]Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия; [2]Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия; [3]ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия
620083, Екатеринбург, проспект Ленина, д. 51
e-mail: maria.ulitko@mail.ru

Исследована морфологическая и функциональная гетерогенность культур тканевых макрофагов, выделенных из различных органов. Выявлены различия жизнеспособности, адгезивных свойств, пролиферативной и секреторной активности альвеолярных, перитонеальных, печеночных и селезеночных макрофагов в культуре клеток.

Ключевые слова: макрофаги, клеточные культуры, жизнеспособность, пролиферативная активность, секреторная активность, адгезивные свойства.

В настоящее время большой интерес вызывает проблема медикаментозной коррекции функций иммунной системы, важным элементом которой являются макрофаги различных тканей, определяющие развитие иммунной реакции и поддержание гомеостаза в организме [1,2]. В связи с этим актуальным является изучение морфофункционального состояния тканевых макрофагов, выделенных из различных органов с целью прогнозирования системного иммунного ответа при терапевтическом вмешательстве.

Первичные культуры альвеолярных и перитонеальных макрофагов, макрофагов печени и селезенки выделяли из органов крыс линии Wistar по общепринятым методикам [3]. Для морфологической характеристики макрофагов определяли ядерно-цитоплазматическое отношение и количество многоядерных клеток. Жизнеспособность макрофагов оценивали по показателям апоптоза с помощью проточного цитофлуориметра. Пролиферативную активность макрофагов определяли по степени окраски ядерного белка Ki-67 в пролиферирующих клетках [4]. Секреторную активность макрофагов оценивали по выявлению неспецифической эстеразы и продукции IL-10 и TNF-α [5].

Установлена морфофункциональная гетерогенность макрофагов различных органов в культуре. Фиксированные макрофаги печени и селезенки, отличаются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Наибольшее количество полинуклеаров наблюдается среди альвеолярных макрофагов: 18% составили двуядерные, 2 % - трехъядерные клетки. Макрофаги всех органов имеют высокую исходную жизнеспособность, однако при длительном культивировании альвеолярные и перитонеальные макрофаги демонстрируют резкое снижение жизнеспособности, проявляющееся процессами раннего апоптоза. Максимальный уровень экспрессии Ki-67, отражающий пролиферативную активность отмечается у альвеолярных (82,29 ± 6,61%) и печеночных (83,33 ± 16,64%) макрофагов.

Наибольшая активность неспецифической эстеразы выявлена у мигрирую-щих фракций – альвеолярных и перитонеальных макрофагов. Перитонеальные макрофаги также специализированы на секреции провоспалительного цитокина TNF-α, тогда как макрофаги печени и селезенки – противовоспалительного цито-кина IL-10. Максимальной адгезивной способностью обладают мигрирующие альвеолярные и перитонеальные макрофаги, однако способность к распластыванию лучше выражена в группе фиксированных макрофагов печени и селезенки. Работа выполнена при финансовой поддержке постановления № 211 Правительства Российской федерации, контракт № 02.A03.21.0006.

Литература:

1. Лямина С.В., Малышев И.Ю. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования имунного ответа // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10 (часть 5) – С. 930-935.
2. Murray P. J., Wynn T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // Nature reviews immunology.

– 2011. – V. 11, №. 11. – P. 723-737.
3. *Иммунологические, цитохимические и биохимические методы исследования фагоцитирующих клеток: метод. рекомендации / под ред. Э.А. Имельбаевой. – Уфа: БГМИ, 1996. – 85 с.*
4. *Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown // Journal of cellular physiology. – 2000. – V. 182, № 3. – P. 311-322.*
5. *Mantovani A., Sica A., Sozzani S. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends in Immunol 2004; 25 (12): 677—686.*

UDC 757.083.3

THE STUDY OF MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF MACROPHAGES OF DIFFERENT ORIGIN IN THE CONDITIONS OF CULTIVATION

Ulitko, M. V. [1,3], Ulyanova A. N. [1,2], Pozdina V. A.[2], Belousova A.V.[2], Bulavintseva T. S.[2], Lugovets D. V. [1,3]

[1] Ural Federal University named after the first President of Russia B.N.Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation;
[2] Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation;
[3] GBUZ SO Center providing specialized types of medical care Institute for Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation;
620083, Ekaterinburg, 51 Lenina street
e-mail: maria.ulitko@mail.ru

We studied morphological and functional heterogeneity of cultures of macrophages isolated from different organs. Revealed differences of viability, adhesion properties, proliferative and secretory activity of peritoneal and alveolar macrophages and macrophages of the liver and spleen in cell culture.

Key words: macrophages, cell culture, viability, proliferative activity, secretory activity, adhesive properties.

Currently great interest is the problem of pharmacological correction of the immune system, an important element of which are the macrophages of different tissues that determine the development of immune responses and maintenance of homeostasis in the body [1, 2]. In this regard, relevant is the study of the morphofunctional state of macrophages isolated from different organs to predict the systemic immune response to the therapeutic intervention.

For the cultivation of alveolar and peritoneal macrophages, macrophages of the liver and spleen they were isolated from organs of rats of Wistar line by conventional methods [3]. For the morphological characteristics of macrophages found the ratio of areas of nucleus and cytoplasm and the number of multinucleated cells. The viability of macrophages was evaluated in terms of apoptosis using a flow cytometer. Proliferative activity of macrophages was determined by the degree of staining of the nuclear protein Ki-67 in proliferating cells [4]. The secretory activity of macrophages was evaluated by the detection of nonspecific esterase and the production of IL-10 and TNF-α [5].

We have shown morphological and functional heterogeneity of macrophages of various organs in culture. Fixed macrophages of the liver and spleen, have an increased ratio of the area of the nucleus and cytoplasm. The greatest number of multinucleated cells are in culture of alveolar macrophages: 18% of cells with two nuclei, and 2% cells with three nuclei. Macrophages all organs have a high initial viability, but in the long process of cultivation of alveolar and peritoneal macrophages show a sharp decline in viability, which is manifested in the processes of early apoptosis. The maximum level of expression of Ki-67, reflecting the proliferative activity observed in the culture of alveolar macrophages (82, 29 ± 6.61%) and culture of macrophages of the liver (83, 33 ± 16.64%).

The biggest activity of nonspecific esterase was identified in the population of migratory macrophages – alveolar and peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages, intended for the secretion of the proinflammatory cytokine TNF-α, whereas macrophages of the liver and spleen secrete anti-inflammatory cytokine Il-10. In the population of migratory alveolar and peritoneal macrophages is most pronounced ability to attach to surfaces, however, the ability to become flat, more typical for populations of fixed macrophages of the liver and spleen. The study is financially supported by the resolution No. 211 of the Government of the Russian Federation contract № 02.A03. 0006.

References:
1. *Lyamina, S. V., Malyshev I. Yu. Polarization of macrophages in the modern concept of formation of immune response // Fundamental research. – 2014. – No. 10 (part 5) – P. 930-935.*
2. *Murray P. J., Wynn T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // Nature reviews immunology.*

– 2011. – V. 11, №. 11. – P. 723-737.
3. *The immunological, cytochemical and biochemical tests of phagocytic cells: method. recommendations / under the editorship of E. A. Imanbaeva. – Ufa: BSMI, 1996. 85 p.*
4. *Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown // Journal of cellular physiology. – 2000. – V. 182, № 3. – P. 311-322.*
5. *Mantovani A., Sica A., Sozzani S. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends in Immunol 2004; 25 (12): 677—686.*

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 571.27

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Гребенщиков И.С., Студенников А.Е., Устинов В.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», Институт экологии человека, Кемерово, Россия, 650065, пр. Ленинградский, д. 10.
e-mail: grimm2605@gmail.com

Был разработан мультиплексный метод определения антител к бензо[а]пирену на основе системы Bio-Plex 200, который позволяет с высокой точностью количественно определять концентрацию антител в сыворотке крови человека.

Ключевые слова: антитела, бензо[а]пирен, мультиплексный метод.

Бензо[а]пирен (ПБ) – полициклический ароматический углеводород, вызывающий различные онкологические заболевания у человека. Наиболее подвержены влиянию БП люди, работающие на заводах и предприятиях. На основе количественного определения АТ к БП в сыворотке крови человека мы предлагаем создать тест-систему для выявления групп риска (1).

Для количественного определения АТ к БП в сыворотке крови человека, был использован мультиплексный метод на базе системы Bio-Plex 200 (2). Для этого на магнитные микросферы с пришитым конъюгатом БП-BSA подавалась разведённая сыворотка крови человека (1:10000). Затем микросферы инкубировали с биотинилированными антителами – Т72 (идиотипическое одноцепочечное человеческое АТ к БП). При этом Т72 связывался со всем «свободным», после первой стадии, БП. Свечение этого комплекса детектировалось по стрептоведину-РЕ прибором Bio-Plex 200. Исходя из уровня свечения, рассчитывалась концентрация АТ в образце, согласно калибровочной кривой. Она строилась по результатам связывания Т72 с БП-микросферами, но без сыворотки крови человека (Рис. 1А), т.е. АТ к БП в сыворотке крови человека можно определять в интервале от 0,125 до 25 нг/мкл.

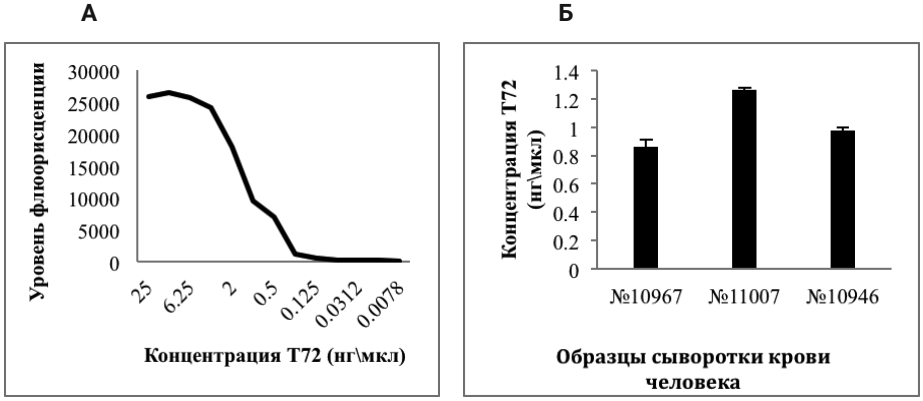


Рис. 1. *Результат анализа на Bio-Plex 200. А – калибровочная кривая. Б – количественное определение АТ против БП в сыворотке крови человека.*

В предварительных экспериментах была определена концентрация АТ к БП в трех образцах сыворотки крови больных раком легкого (при трех повторах каждого эксперимента) (Рис. 1Б). Анализ показал высокую точность измерения и низкий уровень ошибки. Для образца №10967 концентрация составила 3,14 нг/мкл (отклонение 1,5%), для №11007 – 2,74 нг/мкл (отклонение 0,5%), для №10946 – 3 нг/мкл (отклонение 12,5%), т.е. концентрация АТ к БП в сыворотки крови больных раком легкого была ~ 3 нг/мкл.

Работа выполнена по гранту РНФ № 16-15-00034.

Литература:

1. *Ustinov V.A., Matveeva V.A., Kostyanko M.A., Glushkov A.N. Antibodies against benzo[a]pyrene in immunized mouse and in lung cancer patients//Exp. Oncol. 2013. Vol. 35. № 3. P. 207-210.*
2. *Curtis K.A, Kennedy M.S., Charurat M., Nasidi A., Delaney K., Spira T.J., Owen S.M. Development and characterization of a bead-based, multiplex assay for estimation of recent HIV type 1 infection AIDS//Res. Hum. Retroviruses. 2012. Vol. 28. № 2. P. 188-197.*

UDC 571.27

QUANTITIVE METHOD OF ANTIBODIES DETECTION AGAINST BENZO[A] PYRENE IN HUMAN BLOOD SERUM

Grebenshchikov I.S., Studennikov A.E., Ustinov V.A.

Federal State Scientific Institution, Federal Research Centre Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology, Kemerovo, Russia, 650065, pr. Leningradsky, d. 10.
e-mail: grimm2605@gmail.com

Method for the antibodies detection against the benzo[a]pyrene was developed based on a Bio-Plex 200 system. This multiplex method was with high accuracy to quantify the concentration of antibodies in human serum.

Key words: antibodies, benzo[a]pyrene, a multiplex method.

Benzo[a]pyrene (Bp) is polycyclic aromatic hydrocarbon. It results of incomplete combustion of any organic matter. The most people affected by Bp are workers in factories and enterprises, as well as smokers. Bp may cause increasing risk of lung cancer. The surge in the synthesis of antibodies (Ab) against Bp in the human body occurs after contact with Bp. We propose to create a test system based on the quantitative determination of Ab against Bp in human blood serum for identifying high-risk groups, as well as the early diagnosis of lung cancer (1).

The multiplex method based on a Bio-Plex 200 system was used for the quantitative determination of Ab against Bp in human blood serum (2). For this purpose the magnetic microspheres with immobilized Bp conjugated to BSA were supplied to diluted human blood serum (1:10000). Then microspheres were incubated with biotinylated T72 (idiotypic human single-chain Ab against Bp). Thus T72 contacted with all "free" Bp after the first stage. The glow of this complex was detected by streptavidin-PE by Bio-Plex 200 device. The concentration of Ab in the samples was calculated based on the emission level according to the calibration curve, which was resulted of T72 binding to Bp-microspheres, but without human blood serum (Fig. 1A).

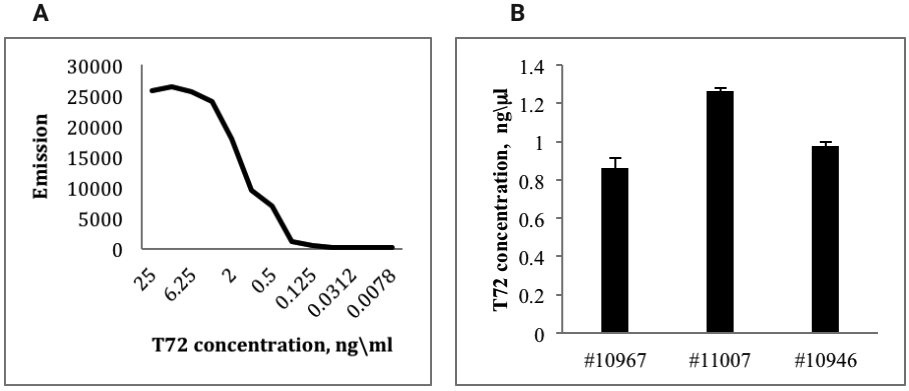


Fig. 1. *The result of the analysis on Bio-Plex 200. A – calibration curve. The T72 binding to Bp-microspheres. B – quantitative determination of Ab against Bp in human blood serum.*

Preliminary experiments of the quantifying Ab against Bp in the blood serum of individuals with lung cancer showed high accuracy (Fig. 1B). The concentration of Ab against Bp for sample #10967 was 3.14 ng/ml (deviation of 1.5%), for #11007 – 2.74 ng/ml (deviation of 0.5%), to #10946 – 3 ng/ml (deviation of 12.5%).

Source of support was the grant of Russian Science Foundation No. 16-15-00034.

References:

1. *Ustinov V.A., Matveeva V.A., Kostyanko M.A., Glushkov A.N. Antibodies against benzo[a]pyrene in immunized mouse and in lung cancer patients//Exp. Oncol. 2013. Vol. 35. № 3. P. 207-210.*
2. *Curtis K.A, Kennedy M.S., Charurat M., Nasidi A., Delaney K., Spira T.J., Owen S.M. Development and characterization of a bead-based, multiplex assay for estimation of recent HIV type 1 infection AIDS//Res. Hum. Retroviruses. 2012. Vol. 28. № 2. P. 188-197.*

УДК 577.112; 571.27; 573.6.086.83

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: ovch@ibch.ru

Антимикробные пептиды (АМП) относятся к эволюционно древним факторам системы врожденного иммунитета многоклеточных организмов, играющим важную роль в их защите от возбудителей инфекций. Исследование свойств АМП позволяет выяснить молекулярные механизмы их действия и лучше понять закономерности функционирования врожденного иммунитета у человека, что открывает путь к разработке новых лекарственных средств.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, врожденный иммунитет, пептидные антибиотики, защитные пептиды.

Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) относятся к эволюционно древним молекулярным факторам системы врожденного иммунитета многоклеточных организмов, играющим важную роль в их защите от возбудителей инфекций. АМП животного происхождения – рибосомально синтезируемые молекулы, обладающие, как правило, амфифильностью и положительным зарядом. Они проявляют широкий спектр антимикробной активности, в том числе в отношении бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов, простейших, оболочечных вирусов. Каждый животный организм вырабатывает собственный набор АМП, позволяющий ему успешно бороться с патогенами. Наряду с прямым антимикробным действием АМП способны участвовать в регуляции иммунных процессов, выступая в качестве регуляторов роста и регенерации тканей, хемоаттрактантов, индукторов синтеза других сигнальных и эффекторных молекул. В настоящее время можно говорить об АМП как о веществах, играющих сложную регуляторную роль в защитных и пролиферативных процессах, что больше соответствует использованию словосочетания «защитные пептиды» в их наименовании. Поиск и структурно-функциональное исследование новых АМП животного происхождения позволяет выяснить молекулярные механизмы действия этих защитных факторов и лучше понять закономерности функционирования врожденного иммунитета у млекопитающих и человека, а также открывает путь к разработке лекарственных средств нового поколения на их основе. В частности, АМП могут стать прототипами новых антибиотиков широко го спектра действия, способными решить проблему резистентности к существующим антимикробным средствам.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

UDC 577.112; 571.27; 573.6.086.83

ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS MOLECULAR FACTORS OF INNATE IMMUNITY

Ovchinnikova T.V.

M.M. Shemyakin & Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10
e-mail: ovch@ibch.ru

Antimicrobial peptides and proteins (AMPs) are evolutionally ancient factors of the innate immunity of multicellular organisms. AMPs play an important role in the defense against infectious agents. Investigation of novel animal AMPs provides a better understanding of basic principles of innate immunity in mammals and humans, as well as open a gate for development of novel medicines, in particular, new antibiotics.

Key words: antimicrobial peptides, innate immunity, peptide antibiotics, host defense peptides

Antimicrobial peptides and proteins (AMPs) are evolutionally ancient factors of the innate immunity of multicellular organisms. AMPs play an important role in the defense against infectious agents. AMPs of animal origin are ribosomally synthesized molecules that have, as a rule, amphiphilic properties and a positive net charge. They have a broad spectrum of antimicrobial activities and can act against bacteria, yeast and filamentous fungi, protozoa, and enveloped viruses. Each animal species develops its own set of AMPs that provide an effective protection against pathogens. Along with direct antimicrobial action, AMPs can also play a role of mediators of the immune system and act as regulators of growth and regeneration of tissues, chemoattractants, and inducers of a synthesis of other signal and effector molecules. Therefore, AMPs are now considered as complex regulators of protective and proliferative processes which better corresponds with their designation as “host defense peptides”. Search and investigation of novel animal AMPs allow to elucidate molecular mechanisms of their action and provide a better understanding of basic principles of innate immunity in mammals and humans, as well as open a gate for development of novel medicines. In particular, AMPs could be the prototypes of novel antibiotics with a broad spectrum of action which can resolve the problem of multiple resistance to the known antimicrobial agents. This study was supported by the Russian Scientific Foundation, project No. 14-50-00131.

.....

УДК 602.68:57.083+557.171

НОВАЯ ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ХОРИОНИЧЕСКОМУ ГОНАДОТРОПИНУ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

Порываева В.А., Агафонова О.А., Марченко А.К., Вторушина И.А., Рукавишников М.Ю.

АО «Вектор-Бест»
Россия, Новосибирская обл., р.п.Кольцово, а/я 121
e.mail: poryvaeva@vector-best.ru

Получена и исследована новая коллекция моноклональных антител (МоАТ) к хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ). Отобраны моноклональные антитела для конструирования «сэндвич»-варианта ИФА для количественного определения как гетеродимера ХГЧ, так и его свободной β-субъединицы.

Ключевые слова: моноклональные антитела, хорионический гонадотропин человека, иммуноферментный анализ, диагностика.

Количественное определение хорионического гонадотропина человека и его свободной β-субъединицы ХГЧ (fβ-ХГЧ) в формате «сэндвич»-варианта ИФА используются для мониторинга беременности и выявления её патологий, а также в диагностике раковых заболеваний. Моноклональные антитела (МоАТ) к ХГЧ являются необходимым компонентом диагностических наборов, обеспечивающим их высокую специфичность.

Нами получена новая представительная коллекция гибридом с синтезом антител к ХГЧ. Для имму-

низации мышей линии BALB/c использовали ХГЧ для инъекций из мочи. Для уточнения специфичности брали гормоны: лютеинизирующий (ЛГ), фолликулостимулирующий (ФСГ), и тиреотропный (ТТГ), выделенные из гипофиза человека, производства «Lee Biosolutions».

В результате слияния спленоцитов иммунизированных животных с клетками миеломы NS1 получили 134 гибридомы со стабильным синтезом антител к ХГЧ. Из них 77 синтезировали антитела, реактивные в непрямом ИФА как с ХГЧ, так и с 3-мя другими гликопротеиновыми гормонами: ЛГ, ФСГ и ТТГ. Мы выделили эти гибридомы в группу «Анти-α-ХГЧ», так как, по нашему предположению, все они синтезировали антитела к общей в составе всех гликопротеиновых гормонов α-субъединице. 28 гибридом продуцировали антитела со специфичностью только к ХГЧ (группа «Анти-β-ХГЧ»), 29 - со специфичностью к ЛГ и ХГЧ одновременно (группа «Анти-β-ХГЧ+ЛГ»). Для подтверждения субъединичной специфичности антител мы разрушили гетеродимер ХГЧ с помощью 8М мочевины и разделили субъединицы ХГЧ с помощью аффинной хроматографии на Br-CN-Сефарозе с иммобилизованными антителами к α-субъединице. Оказалось, что лишь незначительная часть из всех антител, которые реагировали с β-субъединицей в составе гетеродимера ХГЧ, способны связывать свободную β -субъединицу ХГЧ. Это 4-е МоАТ из группы «Анти-β-ХГЧ» и 6-ть - из группы «Анти-β-ХГЧ+ЛГ».

Чтобы исследовать линейность эпитопов мы денатурировали молекулу ХГЧ с помощью раствора 1% SDS и 1% 2-меркаптоэтанола. Оказалось, что все 10 МоАТ к свободной бета-субъединице ХГЧ, и только они в группах «Анти-β-ХГЧ» и «Анти-β-ХГЧ+ЛГ», реагировали с денатурированным гормоном. Это означает, что все полученные нами 10 МоАТ к fβ-ХГЧ, связываются с линейными эпитопами. Полученные нами данные подтверждают то, что бета-субъединица в составе гетеродимера ХГЧ и в свободном состоянии имеет значительные конформационные различия.

Мы также денатурировали молекулу ЛГ с помощью раствора 1% SDS и 1% 2-меркаптоэтанола. 4-е МоАТ из группы «Анти-β-ХГЧ», реагирующие с fβ-ХГЧ, не связывались с денатурированным ЛГ и показывали взаимную конкуренцию в реакции с ХГЧ в конкурентном ИФА. Это позволило предположить, что эпитопы для этих МоАТ могут быть локализованы на С-концевом пептиде 109-145 а.о., специфичном только для ХГЧ.

Получение МоАТ, которые способны реагировать с β-субъединицей ХГЧ как в составе гетеродимера гормона, так и в свободном состоянии, позволило нам подобрать пары антител для конструирования «сэндвич»-варианта ИФА для количественного определения суммарно гетеродимера ХГЧ и его свободной бета-субъединицы.

UDC 602.68:57.083+557.171

A NEW PANEL OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN FOR DIAGNOSTICS

Poryvaeva V. A., Agafonova O. A., Marchenko A. K., Vtorushina I. A., Rukavishnikov M. Yu.

JSC "Vector-best"
Russia, Novosibirsk region, Koltsovo, POB 121
e-mail: poryvaeva@vector-best.ru

A new collection of monoclonal antibodies (MoABs) to human chorionic gonadotropin (hCG) was obtained and investigated. Monoclonal antibodies for construction of the sandwich ELISA were selected to quantify both the heterodimer of hCG and its free beta subunit.

Key words: monoclonal antibodies, human chorionic gonadotropin, immunoassay, diagnostics.

Quantification of human chorionic gonadotropin and its free β-subunit of HCG (fβ-hCG) with the "sandwich" ELISA is used for pregnancy monitoring and identifying abnormalities as well as in cancer diagnosis. Monoclonal antibodies (MoABs) to hCG are a necessary component of diagnostic kits, which ensures their high specificity.

We obtained a new representative collection of hybridomas with synthesis of antibodies to hCG. HCG isolated from urine (Moscow Endocrine Plant) was used to immunize BALB/c mice. Luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), and thyroid stimulating hormone (TSH) isolated from human pituitary gland (Lee Biosolutions) were used to determine the specificity.

One hundred and thirty-four hybridomas with stable synthesis of antibodies to hCG were obtained as a result of fusion of splenocytes from immunized animals with NS1 myeloma cells. Of these, 77 synthesized antibodies reactive in indirect ELISA both with hCG and 3 other glycoprotein hormones: LH, FSH and TSH. We classified these

hybridomas within the “anti-α-hCG” group because we suppose that all of them synthesized antibodies to the α-subunit common to all glycoprotein hormones. Twenty-eight hybridomas produced antibodies with specificity only to hCG (“anti-β-hCG” group), and 29 had specificity simultaneously to LH and hCG (“anti-β-hCG+LH”). To confirm the subunit specificity of antibodies, we destroyed the hCG heterodimer with 8M urea and separated hCG subunits by affinity chromatography on Br-CN-Sepharose with immobilized antibodies to the α-subunit obtained previously in the development of MoABs to TSH. It turned out that only an insignificant portion of all antibodies that reacted with the β-subunit within the hCG heterodimer could bind with the free β-subunit of hCG. These are 4 MoABs from the “anti-β-hCG” group and 6 from the “anti-β-hCG+LH” group.

To investigate the linearity of epitopes, we denatured the hCG molecule with 1% SDS and 1% 2-mercaptoethanol solution. It turned out that all 10 MoABs to the free beta subunit of hCG, and only they in the “anti-β-HCG” and “anti-β-HCG+LH” groups, reacted with the denatured hormone. It means that all 10 MoABs to fβ-hCG obtained by us bind with linear epitopes. Our findings confirm that the beta subunit within the hCG heterodimer and in the free state has significant conformational differences.

We also denatured the LH molecule with 1% SDS and 1% 2-mercaptoethanol solution. Four MoABs from the “anti-β-hCG” group reactive with fβ-hCG did not bind with the denatured LH and showed mutual competition in a reaction with hCG in the competitive ELISA. This suggests that epitopes for these MoABs can be localized in the C-end peptide 109-145 specific only to hCG.

Obtaining MoABs capable of reacting with the β-subunit of hCG both within the heterodimer of the hormone and in the free state allowed us to select pairs of antibodies to construct the sandwich ELISA for quantification of the total heterodimer of hCG and its free beta subunit.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СПЕЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ

RESEARCH AND PRACTICE CONFERENCE

FUNCTIONAL AND SPECIAL FOOD PRODUCTS

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОЦЕНКИ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Концевая А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства Здравоохранения РФ, Москва, Россия
101990, Москва, Петроверигский пер., д. 10, стр.3
e-mail: AKontsevaya@gnicpm.ru

Для обоснования широкого применения функциональных продуктов питания необходимы исследования кинической и экономической эффективности в соответствие с современными рекомендациями и накопленным опытом проведения таких исследований.

Ключевые слова: функциональные продукты питания, клиническая эффективность, экономическая целесообразность, рандомизированные контролируемые исследования.

Развитие рынка функциональных продуктов питания требует убедительных доказательств эффективности в отношении улучшения здоровья при разумных затратах. Убедительная демонстрация клинической и экономической эффективности функциональных продуктов питания возможна только при проведении исследований, построенных на принципах доказательной медицины. Золотым стандартом оценки клинической эффективности являются рандомизированные контролируемые исследования. В отличие от многих других профилактических вмешательств, в случае функциональных продуктов питания возможно проведение плацебо контролируемых исследований кто существенно повышает надежность полученных результатов. Оптимальным также является проведение долгосрочных исследований с оценкой жестких конечных точек (заболеваемости, смертности), однако в случае продуктов питания – это требует очень длительного периода наблюдения, так как это мера первичной профилактики, вследствие чего на данный момент таких исследований в доступной литературе не найдено. Однако применение суррогатных конечных точек, которые четко ассоциированы с прогнозом (уровни артериального давления, уровни липидов), также является допустимым подходом. Такие рандомизированные исследования проводятся за рубежом. Продолжительность таких исследований составляет в среднем 4-12 недель. Например, в исследовании эффективности волокон желтого гороха добавляемых к определенным продуктам (15 г в день) показано, что в группе активного вмешательства снизилась общая калорийность рациона на 16% и улучшились показатели углеводного обмена (1) по сравнению с плацебо. В некоторых странах существуют рекомендации по проведению исследований по демонстрации эффективности тех или иных продуктов питания (2).

Возможность массового внедрения функциональных продуктов зависит также от экономических аспектов. Причем стоимость продуктов лишь один из аспектов, важно сопоставление стоимости и эффекта в рамках анализа «затраты-эффективность». Так например, в исследовании эффективности риса обогащенного каротином было показано, что применение этого продукта экономически целесообразнее по сравнению с фармакологическими препаратами при необходимости коррекции витамина А (3).

Таким образом, оценка клинической и экономической эффективности функциональных продуктов может быть важным этапом для обоснования целесообразности их широкого применения.

Литература:
1. *Lambert JE, Parnell JA, Tunnicliffe JM et al. Consuming yellow pea fiber reduces voluntary energy intake and body fat in overweight/obese adults in a 12-week randomized controlled trial.* Clin Nutr. *2016: S0261-5614(16)00004-2. doi: 10.1016/j.clnu.2015.12.016*
2. *Best practice for food-based clinical trials. Guidance for planning, conducting and reporting on human studies to support health claims. Minister of agriculture and anti-food Canada, 2013.*
3. *Stein, A.J., Sachdev H.P.S. and Qaim M. Potential impact and cost-effectiveness of Golden Rice. Nature Biotechnology 2006; 24: 1200-1201.*

.....

METHODICAL BASES OF ASSESSMENT OF THE CLINICAL EFFICACY AND COST-EFFECTIVENESS OF FUNCTIONAL FOODS

Kontsevaya A.V.

Federal State Institution National Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian
101990, Moscow, Petroverigsky per. 10/3
e-mail: koncanna@yandex.ru

To justify the wide use of functional foods it is necessary to conduct clinical and economic studies in accordance with the current guidelines and previous experience.

Key words: functional food, clinical effectiveness, economic feasibility, randomized controlled trials.

Market development of functional foods requires strong evidence on the effectiveness of these products in improving health at a reasonable cost. Strong demonstration of the clinical and cost-effectiveness of functional foods can be achieved only in research, built on the principles of evidence-based medicine. Randomized controlled trials are the gold standard of clinical efficacy evaluation. Unlike many other preventive interventions, in the case of functional foods placebo-controlled studies can be organized, what significantly improves the reliability of the results. Long studies assessing hard endpoints (morbidity, mortality) are optimal, but in case of food - it requires a very long observation period, as it is primary prevention, whereby at the moment in the literature such long randomized control studies are unavailable, only observational one. However, the use of surrogate endpoints that are clearly associated with prognosis (blood pressure levels, lipid levels), as is feasible approach. Such randomized trials are often conducted abroad. The duration of such studies is the average of 4-12 weeks. For example, a study of the effectiveness yellow peas fibers added to certain products (15 g daily) showed that total caloric intake has decreased by 16% and improved carbohydrate metabolism in the intervention group (1) compared with placebo. In some countries, there are recommendations for research to demonstrate the effectiveness of certain foods (2).

Market access of functional products is also depends on the economic aspects. Moreover, the cost of products is only one aspect, it is important to consider both costs and effects in costs-effectiveness analysis. For example, the study golden rice with carotene has been shown that the use of this product is more cost-effective compared with pharmacological agents in patients with vitamin A deficit (3).

Thus, to evaluate the clinical and economic effectiveness of functional foods can be an important step to support the appropriateness of their widespread use.

References:
1. *Lambert JE, Parnell JA, Tunnicliffe JM et al. Consuming yellow pea fiber reduces voluntary energy intake and body fat in overweight/obese adults in a 12-week randomized controlled trial.* Clin Nutr. *2016: S0261-5614(16)00004-2. doi: 10.1016/j.clnu.2015.12.016*

2. *Best practice for food-based clinical trials. Guidance for planning, conducting and reporting on human studies to support health claims. Minister of agriculture and anti-food Canada, 2013.*
3. *Stein, A.J., Sachdev H.P.S. and Qaim M. Potential impact and cost-effectiveness of Golden Rice. Nature Biotechnology 2006; 24: 1200-1201.*

УДК 543:547.913, 544.3.03: 544.032: 544.77

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ НИЗКОЖИРНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫМИ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ

Семёнова М. Г., Антипова А.С., Мишарина Т.А., Пальмина Н. П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук
119334, Москва, ул. Косыгина, д.4
e-mail: mariagersem@mail.ru

В докладе будут представлены пути формирования пищевых ингредиентов для доставки незаменимых омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот в низкожирные пищевые продукты, а также будут обсуждены ключевые структурные и термодинамические параметры таких ингредиентов, определяющие их многофункциональность.

Ключевые слова: пищевые биополимеры, незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты, растительные антиоксиданты, защита от окисления, структурные параметры, контролируемая биодоступность *in vitro*.

В нашей работе показано, что объединение инкапсулирующей способности пищевых биополимеров с антиоксидантной активностью природных растительных антиоксидантов позволяет эффективно ингибировать окисление биологически активных липидов, включающих незаменимые омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), в процессе хранения, а также создавать растворимые в водной среде формы ПНЖК, обеспечивающие также и контролируемое высвобождение ПНЖК в желудочно-кишечном тракте человека in-vitro. С помощью комбинации высокоточных физико-химических методов (статического и динамического многоуглового лазерного светорассеяния (ЛС-01, «Научные приборы» Санкт-Петербург, Россия); динамического светорассеяния (Zetasizer Nano ZS Malvern (UK)); атомно-силовой микроскопии (SOLVER P47 (SMENA, NT-MDT, Россия)), дифференциально-сканирующей калориметрии (ДАСМ-4, Пущино, Россия), электронно-парамагнитно-резонансной спектроскопии (ЭПР) (Bruker EMX spectrometer (Germany)) нам удалось сделать выводы и предположения о молекулярных механизмах формирования таких комплексных частиц, а также выявить ключевые структурные и термодинамические параметры, определяющие их многофункциональность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 14-16-00102.

UDK 543:547.913, 544.3.03: 544.032: 544.77

MOLECULAR DESIGN OF FOOD INGREDIENTS FOR FORTIFICATION OF LOW FAT FOOD STUFF BY OMEGA-3 AND OMEGA-6 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

Semenova M. G., Antipova A.S., Misharina T.A., Palmina N. P.

N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia 119334, Moscow, Kosygin str., 4
e-mail: mariagersem@mail.ru

The ways of the molecular design of the food ingredients for the delivery of the essential omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) into the low-fat food stuff will be presented as well as the key both structural

and thermodynamic parameters, underlying the multifunctionality of such ingredients, will be discussed.

Key words: food-grade biopolymers, essential polyunsaturated fatty acids, plant antioxidants, protection against oxidation, structural parameters, controlled bioavailability in vitro

We have shown in our work, that the combination of the encapsulating abilities of food-grade biopolymers with the antioxidant activity of the natural plant antioxidants will lead to: (i) the effective inhibition of the oxidation of biologically active lipids, involving PUFAs, during their storage; (ii) the creation of both the highly soluble in an aqueous medium PUFA forms; (iii) the provision of the controlled PUFAs release in the gastrointestinal tract in vitro. Using a combination of the precision physico-chemical methods (static and dynamic multiangle laser light scattering (LS-01, «Scientific Instruments» St. Petersburg, Russia); dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS Malvern (UK)), atomic-force microscopy (SOLVER P47 (SMENA, NT-MDT, Russia)); differential scanning calorimetry (DASM-4, Pushchino, Russia) and electron spin resonance spectroscopy (Bruker EMX spectrometer (Germany)) we have suggested the molecular mechanisms of the complex particles formation, as well as, the key both structural and thermodynamic parameters determining their multifunctionality.

This work was supported by the Russian Scientific Foundation, project no. 14-16-00102.

УДК 543:547.913

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И ЭКСТРАКТОВ ПРЯНО-АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Мишарина Т.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук
119334, Москва, ул. Косыгина, д.4
e-mail: tmish@rambler.ru

В докладе приведены результаты изучения способности эфирных масел и экстрактов различных пряно-ароматических растений влиять на автоокисление полиненасыщенных жирных кислот льняного масла.

Ключевые слова: антиоксиданты, эфирные масла, льняное масло, полиненасыщенные жирные кислоты.

Растительное масло, полученное холодным прессованием семян льна содержит более 90% ненасыщенных кислот, включая около 60% незаменимой ω-3 линоленовой кислоты. Это масло считается одним из самых полезных, но его широкое употребление в питании ограничено низкой стабильностью линоленовой кислоты. Для повышения устойчивости полиненасыщенных жирных кислот в пищевых продуктах используют антиоксиданты, в том числе природные смеси веществ – эфирные масла и экстракты пряностей. Изучение действия таких препаратов является актуальным направлением в современной химии пищевых веществ. Эфирные масла являются единственными натуральными ароматизаторами и обладают различными видами биологической активности, включая биоантиоксидантную.

В докладе приведены результаты исследования антиоксидантных свойств эфирных масел, относящихся к мультифункциональным антиоксидантам, действующих по различным механизмам и способных оказывать синергетическое влияние друг на друга. Показано, что эффективность ингибирования автоокисления жирных кислот из льняного масла зависит от различных факторов: от состава и структуры антиоксидантов, их концентрации, температуры, типа и состава окисляемого субстрата, физического состояния пищевого продукта, наличия прооксидантов и синергистов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 14-16-00102.

UDC 543:547.913

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS FROM SPICES IN THE FOODSTUFFS

Misharina T. A.

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia 119334, Moscow, Kosygin str., 4
e-mail: tmish@rambler.ru

The results of studies of ability of essential oils and extracts from various spices to influence on the autooxidation of polyunsaturated fatty acids of an linseed oil are given in the present report.

Key words: antioxidants, essential oils, linseed oil, polyunsaturated fatty acids.

Oil from linseeds contains about 90% unsaturated fatty acids, including about 60% of indispensable ω-3 unsaturated linolenic acid. This oil is one of the most useful vegetable oil. The main factor that limits the wide use of linseed oil is the low stability of linolenic acid. Therefore, in order to increase the stability of unsaturated fatty acids in foodstuffs it is necessary to use antioxidants, including natural essential oils and extracts from spices. The investigations of action of such preparations are the actual trend in the modern chemistry of food substances. Essential oils and extracts from spices are the really natural flavorings, they posses various biological activities including bioantioxidant.

The results of the investigation of antioxidant properties of essential oils are given in this report. Essential oils belong to multifunctional antioxidants which can act by different mechanisms and show synergetic effects. It was found that the inhibition efficiency of autooxidation of fatty acids from linseeds depends on various factors: the composition and structures of antioxidants, their concentrations, temperature, the composition of oxidized substrates, physical properties of foodstuffs and on the content of prooxidants and synergetics.

This work was supported by the Russian Scientific Foundation, project no. 14-16-00102.

.....

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ: КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Карамнова Н.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства Здравоохранения РФ, Москва, Россия
101990, Москва, Петроверигский пер., д. 10, стр.3
e-mail: nkaramnova@gnicpm.ru

Эффективность функциональных пищевых продуктов в профилактике и коррекции алиментарно-зависимых факторов риска и состояний на индивидуальном и популяционном уровнях, явилось обоснованием для включения данных продуктов в клинические рекомендации.

Ключевые слова: функциональные продукты питания, коррекция, профилактика, алиментарно-зависимые факторы риска.

Пищевые продукты, содержащие в своем составе ингредиенты, способные оказывать оздоравливающий эффект на организм человека относятся к функциональным продуктам (ГОСТ Р52349-2005). Данные продукты предназначены для систематического потребления всеми возрастными группами здорового населения с целью профилактики и снижения риска развития хронических неинфекционных заболеваний, имеющих алиментарно-обусловленный компонент. В этой связи возрастающий научный интерес к функциональным продуктам питания, обоснован совершенствованием подходов профилактики в отношении наиболее социально-значимых для общества заболеваний. Пищевые продукты, содержащие в составе функциональные ингредиенты, способствующие модификации алиментарно-зависимых факторов риска могут быть использованы для большинства хронических неинфекционных заболеваний в превентивных целях.

На индивидуальном, групповом и популяционных уровнях профилактики наибольший интерес представляют пищевые продукты, способные снижать уровень артериального давления, влиять на уровни липопротеидов и толщину комплекса интима-медия с целью профилактики развития атеросклероза, оказывать влияние на уровни инсулина и глюкозы крови, а также на коррекцию общей и жировой массы тела с целью профилактики ожирения и сахарного диабета, способствовать увеличению костной плотности и оптимизации механизма усвоения кальция с целью профилактики переломов, а также функциональные продукты питания способные предотвращать дефицит питательных веществ в организме человека. На сегодняшний день, существует весомая доказательная база в отношении благоприятных эффектов омега-3 полиненасыщенных жиров в коррекции гипертриглицеридемии (уровень А, ++), фитостеролов (уровень А, +++) и пищевых волокон (уровень А, ++) в коррекции уровней общего холестерина и холестерина низкой плотности, что явилось основанием для включение приема продуктов с данными функциональными ингредиентами в клинические рекомендации [1-4]. Результаты клинических исследований убедительно продемонстрировали 7-10% снижение уровня общего холестерина и холестерина низкой плотности от исходных показателей при приеме йогурта обогащенного 2г фитостеролов и снижение на 18% и 22% липидных показателей при приеме данного йогурта на фоне антиатерогенного питания [5]. Прием 2-3г омега-3 полиненасыщенных жирных кислот способствует снижению уровня триглицеридов на 25-30% у лиц с нормо- и гипертриглицеридемией. Дополнительный к ежедневному рациону питания прием 5-15г пищевой водорастворимой клетчатки также влечет снижение уровня липопротеидов низкой плотности в среднем на 5% от исходного значения. Эффективность коррекции йододефицитных состояний и заболеваний на уровне популяции позволила использовать данный подход более чем в 120 стран мира, что закреплено в рекомендациях ВОЗ [6,7]. Анализируя вклад алиментарных факторов в развитие хронических неинфекционных заболеваний можно отметить возрастающую потребность с позиций совершенствования индивидуальной и популяционной профилактики в функциональных пищевых продуктов, способствующий снижению потребления соли/натрия, добавленного сахара, насыщенных жиров и транс-изомеров жирных кислот [8, 9].

Литература:
1. *Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации V пересмотр. Москва, 2012 г.*
2. *2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias.*
3. *CVD Prevention in Clinical Practice (European Guidelines on), 2016.*
4. *Functional Foods: Opportunities and Challenges. The report of Experts. Institute of Food Technologists, USA.*
5. *Погожева А.В., Дербенева С.А. Оценка эффективности применения продукта Данакор, обогащенного фитостеринами, в диетотерапии больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Кардиология ,№9, 2008, с.47-49.*
6. *Effect and safety of salt iodization to prevent iodine deficiency disorders: a systematic review with meta-analyses. WHO, 2014*
7. *Salt reduction and iodine fortification strategies in public health: report of a joint technical meeting convened by the World Health Organization and The George Institute for Global Health in collaboration with the International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders Global Network, Sydney, Australia, March 2013.*
8. *Promoting a healthy diet for the WHO Eastern Mediterranean Region. User-friendly guide, 2012.*
9. *Глобальный план действий по профилактике неинфекционных заболеваний и борьбе с ними. План действий на 2013-2020 гг. ВОЗ, 2014.*

FUNCTIONAL FOODS: CLINICAL GUIDELINES

Karamnova N.S.

Federal State Institution National Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian
101990, Moscow, Petroverigsky per. 10/3
e-mail: nkaramnova@gnicpm.ru

The efficiency of functional foods in the prevention and compensation of nutrition-related risk factors and conditions at the individual and population level was justification for the inclusion of these products in the clinical guidelines.

Key words: functional foods, correction, prevention, nutrition-related risk factors.

Functional products are the foods, containing ingredients in its composition, that are able to provide revitalizing effect on the human body (State standard R52349-2005). These products intended for regular use by all age groups of healthy people for prevention and reducing the risk of chronic non-communicable diseases with alimentary-mediated component. Thereby, the increasing scientific interest in functional foods is justified by improving approaches in the prevention of the most socially significant diseases. The foods with functional ingredients that contribute to the modification of nutrition-related risk factors could be used preventively for the majority of chronic non-communicable diseases. The foods that reduce blood pressure, effect on the levels of lipoproteins and the thickness of the intima-media for prevention of atherosclerosis, affect on levels of insulin and blood glucose and on the total and fat body mass for prevention of obesity and diabetes, contribute to the increase of bone density and the optimization of mechanism of calcium absorption for fracture prevention and the functional foods that prevent nutrient deficiency in humans are the most interesting at the individual, group and population levels of the prevention. Currently, there a significant evidence base for the beneficial effects of omega-3 polyunsaturated fats for the correction of triglycerides (level A ++), phytosterols (level A +++) and dietary fiber (level A ++) and the total and low density cholesterol, that was the basis for the inclusion of these products with such functional ingredients in clinical guidelines [1-4]. Results of clinical studies have demonstrated 7-10% total and low density cholesterol reduction while receiving the yogurt with 2g of phytosterols and 18% and 22% lipid parameters reduction while receiving such yogurt with the anti-atherogenic diet [5]. Admission of 2-3g of omega-3 polyunsaturated fatty acids reduces triglycerides by 25-30% in patients with and without hypertriglyceridemia. Additional to the daily dietary intake admission of 5-15g of food soluble fiber also reduces the low density lipoprotein levels by an average of 5% from baseline. The effectiveness of the correction of iodine deficiency conditions and diseases by admission of relevant products at the population level allowed to use this approach in more than 120 countries that was published in the WHO guidelines [6,7]. The analysis of the contribution of nutritional factors in the development of chronic non-communicable diseases identified the increasing demand for functional foods that reduce the salt/sodium intake, added sugars, saturated fats and trans fatty acid isomers from the standpoint of improving the individual and population prevention [8,9] .

Reference:
1. *National Guidelines on Lipid Disorders and Atherosclerosis. V edition, Moscow, 2012.*
2. *2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias.*
3. *CVD Prevention in Clinical Practice (European Guidelines on), 2016.*
4. *Functional Foods: Opportunities and Challenges. The report of Experts. Institute of Food Technologists, USA.*
5. *Pogozheva AV, Derbeneva SA. Evaluating the effectiveness of Danakor product enriched with phytosterols in dietary management of patients with cardiovascular diseases. Cardiology, №9, 2008 p.47-49.*
6. *Effect and safety of salt iodization to prevent iodine deficiency disorders: a systematic review with meta-analyses. WHO, 2014*
7. *Salt reduction and iodine fortification strategies in public health: report of a joint technical meeting convened by the World Health Organization and The George Institute for Global Health in collaboration with the International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders Global Network, Sydney, Australia, March 2013.*
8. *Promoting a healthy diet for the WHO Eastern Mediterranean Region. User-friendly guide, 2012.*
9. *Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. WHO, 2014.*

УДК 579.25

ПРОБИОТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

Аверина О.В., Даниленко В.Н.

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва, Россия
Научно-исследовательский центр биотехнологии антибиотиков и других биологически активных веществ «БИОАН», Москва, Россия
119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д. 3
e-mail: olgavr06@mail.ru

Отобраны эффективные пробиотические штаммы с определенными таргетными свойствами: *Lactobacillus brevis* 47f, *L. brevis* 15f, *L. rhamnosus* 313, *L. rhamnosus* 40f с антиоксидантной активностью; *Bifidobacterium* subsp. *longum* GT15 как активный иммуномодулятор; *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f и *B. adolescentis* 150, *B. angulatum* GT 102 как активные продуценты ГАМК.

Ключевые слова: пробиотики, бифидобактерии, лактобациллы, антиоксидантные свойства, гамма-амино-

маслянная кислота, иммуномодуляция.

Многолетние клинические наблюдения за лечебной и профилактической эффективностью пробиотиков на основе представителей нормальной микрофлоры человека показали, что наиболее эффективное влияние на регуляцию состояния здоровья человека оказывают бифидобактерии и лактобациллы. Эти бактерии благотворно влияют на здоровье человека через антагонизм к патогенным бактериям, способность к модуляции местного и системного иммунного ответа, участие в стабилизации и сохранении кишечного барьера, способность преобразовывать различные питательные компоненты в биологически активные молекулы (Sanchez et al., 2017). Н*ормализуя микробиоценоз кишечника, пробиотические бактерии* влияют не только на регуляцию деятельности кишечника, но и других органов и систем, поддерживая, таким образом, общий гомеостаз организма хозяина. Была выявлена у отдельных штаммов бифидобактерий и лактобацилл способность продуцировать гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), оказывать психотропное действие и проявлять активность, снижающую симптомы депрессии и тревожного состояния (Yunes et al., 2016; Аверина и Даниленко, 2017). Являясь источником антиоксидантов, лактобацилы и бифидобактерии повышают антиоксидантный статус организма. Потенциально возможные позитивные эффекты присутствия в организме человека бифидобактерий и лактобацилл в значительной степени зависят от способности и активности конкретных штаммов бактерий. В результате проведенных исследований большого количества штаммов бифидобактерий и лактобацилл из коллекции лаборатории Генетики микроорганизмов ИОГен РАН в Научно-исследовательском центре БИОАН (http://bioan.ru) были отобраны эффективные штаммы с определенными таргетными свойствами, а именно: штаммы *Lactobacillus brevis* 47f, *L. brevis* 15f и *L. rhamnosus* 313, *L. rhamnosus* 40f с антиоксидантной активностью (Заявка на изобретение № 2015150244 от 24.11.2015), синтезирующие глутатион и комплекс внутриклеточных антиоксидантов; штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* GT15 как активный иммуномодулятор (Заявка на изобретение № 2015128888 от 16.07.2015.); штаммы *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f (Патент N 2575625) и *B. adolescentis* 150, *B. angulatum* GT 102 (Заявка на изобретение № 2015122505 от 11.06.2015) как активные продуценты ГАМК. У всех штаммов установлена последовательность генома (геномы секвенированы и депонированы в GenBank (WGS)). Предлагаемые штаммы, в отличие от существующих на рынке, обладают способностью синтезировать определенные активные соединения и, к тому же, выделены от жителей России. Штаммы имеют большие перспективы использования в функциональных пищевых продуктах, биологически активных добавках, лекарственных средствах.

Литература:
1. *Sa´nchez B., Delgado S., Blanco-M´ıguez A., Lourenc A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease // Mol. Nutr. Food Res. 2017. Vol. 61. № 1. P. 1-15.*
2. *Аверина О.В., Даниленко В.Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // Микробиология. – 2017. – Т. 86, №. 1. – С. 1-19.*
3. *Yunes R.A., Poluektova E.Y., Dyachkova M.S., Klimina K.M., Kovtun A.S., Averina O.V., Orlova V.S., Danilenko V.N., GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota // Anaerobe. 2016. Vol. 42. P. 197-204.*
4. *Даниленко В.Н., Юнес Р.А., Полуэктова Е.У. Штаммы Lactobacillus plantarum и Lactobacillus brevis, синтезирующие гамма-аминомасляную кислоту // Патент России № 2575625,С1.2014.*

УДК 579.25

PROBIOTIC REGULATION OF HUMAN HEALTH

Averina O. V., Danilenko V. N.

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia
Research center of biotechnology of antibiotics and other biologically active substances "BIOAN", Moscow, Russia
119333, Moscow, Gubkina str. 3
e-mail: olgavr06@mail.ru

Selected effective probiotic strains with defined target properties*: Lactobacillus brevis* 47f, *L. brevis* 15f, *L. rhamnosus* 313, *L. rhamnosus* 40f with antioxidant activity; *Bifidobacterium* subsp. *longum* GT15 as active immunomodulator; *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f and *B. adolescentis* 150, *B. angulatum* GT 102 as active producers of gamma-aminobutyric acid.

Key words: probiotics, Bifidobacterium, Lactobacillus, antioxidant, gamma-aminobutyric acid, immunomodulation.

Longstanding clinical observation of the medical and preventive efficiency of probiotics based on representatives of normal human microflora showed that bifidobacteria and lactobacilli exert the most effective influence on the regulation of health. These bacteria

are beneficial to human health through antagonism to pathogenic bacteria, ability to modulate local and systemic immune response, participating in the stabilization and preservation of the intestinal barrier, the ability to convert various nutrients into biologically active molecules (Sa´nchez et al., 2017). Normalizing the microbiocenose, probiotic bacteria influence not only on the regulation of the activity of the intestine, but other organs and systems, supporting, thus, the overall homeostasis of the host organism. In some strains of bifidobacteria and lactobacilli were identified the ability to produce gamma-aminobutyric acid (GABA), demonstration of a psychotropic action and activity, that can reduces the symptoms of depression and anxiety (Yunes et al., 2016; Averina and Danilenko, 2017). As a source of antioxidants, lactobacilli and bifidobacteria increase the antioxidant status of the organism. Potential positive probiotic effects of the presence in humans of bifidobacteria and lactobacilli substantially depend on the ability and activity of specific strains of bacteria. The result of the research a large number of strains of bifidobacteria and lactobacilli from the collection of the laboratory of Genetics of microorganisms of Institute of General genetics RAS research in BIOAN (http://bioan.ru) were selected efficient strains with defined target properties: *Lactobacillus brevis* 47f, *L. brevis* 15f and *L. rhamnosus* 313, *L. rhamnosus* 40f with antioxidant activity (Claim for a discovery No. 2015150244 from 24.11.2015) synthesizing glutathione and the complex intracellular antioxidants; strain *Bifidobacterium longum* subsp. *longu*m GT15 as active immunomodulator (Claim for a discovery No. 2015128888 from 16.07.2015.); the strains of *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f (Patent N 2575625) and *B. adolescentis* 150, *B. angulatum* GT 102 (Claim for a discovery No. 2015122505 from 11.06.2015) as active producers of GABA. All strains have established the genome sequence (genomes sequenced and deposited in GenBank (WGS)). Offer strains, unlike existing on the market, have the ability to synthesize specific active compounds and, moreover, isolated from the resident of Russia. Strains have great potential for using in functional foods, dietary supplements, medicinal preparations.

References:
1. *Sa´nchez B., Delgado S., Blanco-M´ıguez A., Lourenc A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease // Mol. Nutr. Food Res. 2017. Vol. 61. № 1. P. 1-15.*
2. *Yunes R.A., Poluektova E.Y., Dyachkova M.S., Klimina K.M., Kovtun A.S., Averina O.V., Orlova V.S., Danilenko V.N., GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota // Anaerobe. 2016. Vol. 42. P. 197-204.*
3. *Averina O. V., Danilenko V. N. Human Intestinal Microbiota: Role in Development and Functioning of the Nervous System // Microbiology. 2017. Vol. 86. № 1. P. 1-19.*
4. *Danilenko V. N., Yunes R. A., Poluektova E. U. The Strains of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus brevis, producing gamma-aminobutyric acid // Patent of the Russian Federation № 2575625, C1. 2014.*

.....

УДК 637.5:641.56

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Дыдыкин А.С., Асланова М.А.

ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова», Москва, Россия
109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26
e-mail: das_tih@mail.ru

Разработан широкий ассортимент функциональных продуктов на мясной основе, снижающих риск возникновения ожирения, сердечно-сосудистой патологии, заболеваний органов пищеварения.

Ключевые слова: функциональные продукты на мясной основе, вареные колбасные изделия, полуфабрикаты, консервы

Функциональный продукт – пищевой продукт, предназначенный для систематического употребления в составе пищевых продуктов всеми возрастными группами здорового населения, обладающий научно обоснованными и подтвержденными свойствами, снижающий риск развития заболеваний, связанных с

питанием, предотвращающий дефицит или восполняющий в организме человека дефицит питательных веществ, сохраняющий или улучшающий здоровье за счет наличия в его составе функциональных пищевых ингредиентов.

Существует два основных принципа «превращения» пищевого продукта в функциональный: обогащение продукта нутриентами в процессе его производства; прижизненная модификация, т.е. получение сырья с заданным компонентным составом, что позволяет усилить его функциональную направленность.

Использование мяса как сырья для производства функциональных продуктов весьма перспективно. Наличие в мясном сырье биологически активных веществ широкого спектра физиологического действия, таких как полноценный животный белок, биоактивные пептиды, минеральные вещества (цинк, железо, селен), витамины, жирные кислоты и другие определяет его функциональные свойства: улучшение общего статуса организма, стимуляция активности ферментов системы детоксикации и антиоксидантной защиты, повышение иммунного потенциала и резистентности.

Использование различных видов мясного сырья, растительных компонентов, белковых, витаминных и минеральных добавок дают возможность создания качественно новых функциональных продуктов с заданным содержанием жира и белка, жирнокислотным, аминокислотным, минеральным и витаминным составами, а также с повышенным содержанием органических форм биологически активных нутриентов.

ФГБНУ «ВНИИМП им. В. М. Горбатова» проводит широкие научно-исследовательские работы в области разработки функциональных продуктов. Создан большой ассортимент мясных продуктов, снижающих риск возникновения ожирения, сердечно-сосудистой патологии, заболеваний органов пищеварения, а также продуктов для гражданских лиц и военнослужащих, находящихся в зонах сильного загрязнения окружающей среды, в том числе с повышенным уровнем радиации. Разработаны консервы и вареные колбасные изделия для питания беременных и кормящих женщин, вареные колбасные изделия для геродиетического питания, специализированные мясные консервы для питания людей, находящихся в условиях неблагоприятного экологического воздействия. Для профилактики желудочно-кишечных заболеваний разработаны полуфабрикаты мясные рубленые с кониной, обогащенные клетчаткой, нутом, шротом из расторопши, витаминами и минеральными веществами, и паштет, обогащенный пептидами, полученными в результате переработки сычуга крупного рогатого скота. Созданы продукты для людей, предрасположенных к гипертонической болезни - полуфабрикаты, обогащенные витаминами (С, β-каротином), пищевыми волокнами и фосфолипидами.

Для продвижения продукции функционального питания на рынок необходимо на государственном уровне обеспечить заинтересованность производителей (через экономические стимулы), заинтересованность потребителей (через просветительскую работу и информативную рекламу), а также научное обоснование и клинические исследования разрабатываемого ассортимента нового поколения продуктов функционального и здорового питания.

СЕКЦИЯ

ИННОВАЦИИ В МЕДИЦИНСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

SECTION

INNOVATION IN MEDICAL BIOTECHNOLOGY

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 577.6.083.3.88

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКЕ

Красильников И. В.

ФГУП «СПБНИИВС ФМБА России» г. Санкт-Петербург,
Красное Село, ул. Свободы,52
e-mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

Вакцины оказались наиболее эффективным инструментом для борьбы с инфекциями. Показана дальнейшая возможность повышения их эффективности в случае применения инновационных платформ для получения антигенов вирусов и бактерий, а также при применении в вакцинах новых адъювантов.

Ключевые слова: антигены вирусов и бактерий, вакцины, иммунный ответ, ДНК-вакцины

Одним из наиболее экономически эффективных лекарственных средств, которые на протяжении истории человечества спасли жизни миллиардам людей являются вакцины.

Иммунизация способствовала ликвидации оспы, сократила в 3 раза детскую смертность от кори, привела, практически, к ликвидации полиомиелита в Северной Америке и Европе. Недаром вакцинация признана одним из основных достижений 20-го века.

Однако, до сих пор, детскими вакцинами не обеспечен каждый пятый ребенок на планете, отчего ежегодно погибает около 1,5 млн. детей от таких распространенных инфекций как пневмонии, диареи, гепатиты и другие инфекции.

Более того, все чаще при изучении соматических заболеваний ученые находят возбудителей инфекций, причастных к болезни.

К настоящему времени созданы эффективные вакцины против десятков бактериальных и вирусных возбудителей. Однако при массовых вакцинациях населения производители столкнулись с определенными проблемами:

-для некоторых вирусов не было найдено систем культивирования, пригодных для размножения (вирусы гепатита В и С).

-имеющиеся субстраты, в которых вирус размножается, не позволяют производить достаточное количество антигенов для производства вакцин,

- иммуногенность современных вакцин не достаточна для эффективной профилактики заболевания.

Вторая и третья проблемы особенно актуальны для вируса гриппа, пандемия которого предсказывается в ближайшие годы.

Решить эти основные проблемы производства вакцин позволяют методы генной инженерии и клеточной энзимологии, с помощью которых создаются рекомбинантные вакцины.

К одной из первых рекомбинантных вакцин относится живая аттенуированная гриппозная вакцина, полученная реассортацией. Вирус гриппа имеет фрагментированный геном, и при размножении в клетке различных штаммов вируса возможен обмен фрагментами генов основных поверхностных белков: гема-

гглютинина и нейраминидазы.

Технология инфекционного клонирования была использована для создания ряда аттенуированных вакцин, в том числе для вакцины лихорадки Денге. Были получены бивалентные штаммы вируса, на основе которых производится универсальная вакцина, формирующая иммунный ответ к четырем серотипам вируса Денге.

В настоящее время ведутся исследования на основе описанной платформы по созданию комбинированной вакцины против желтой лихорадки и лихорадки Денге.

В качестве вектора используется вирус желтой лихорадки, геном которого содержит гены, кодирующие поверхностные детерминанты всех четырех типов вируса Денге.

Значительной победой генной инженерии в области создания эффективных вакцин стала вакцина против гепатита В. Ген поверхностного белка этого вируса (HBs Ag) в составе плазмиды удалось интегрировать в клетки дрожжей. Был получен штамм-продуцент, способный синтезировать гликозилированный поверхностный антиген. Этот рекомбинантный белок является основой эффективной вакцины против гепатита В, которая уже 20 лет широко применяется во всем мире.

В настоящее время ведутся исследования по созданию терапевтической вакцины гепатита В. Создан рекомбинантный белок, содержащий детерминанты внутреннего и поверхностного антигенов вируса гепатита В. Такая вакцина способна подавлять синтез вируса гепатита В в клетках человека.

Развитие терапевтических вакцин зависит от успехов в области ДНК-вакцин, способных вызывать как клеточный так и гуморальный иммунный ответ.

В настоящее время ряд американских компаний приступил к производству терапевтических вакцин против меланомы, колоректального рака, лейкозов и других опухолей.

Ведутся работы по созданию вакцин против ревматоидного артрита, рассеянного склероза, миастении, аллергических заболеваний.

Для повышения иммуногенности современных вакцин исследователи все чаще применяют адъюванты, способные активировать клеточный или гуморральный иммунный ответ. Важно, чтобы введение адъювантов в вакцины не приводило к повышению реактогенности или аллергенности конечного препарата. К настоящему времени разработан ряд адъювантов, которые или получили разрешение, или находятся в процессе получения разрешения на применение в составе вакцин.

.....

UDC 577.6.083.3.88

INNOVATIVE PREVENTIVE VACCINATION TECHNOLOGIES

Krasilnikov I.V.

Saint-Petersburg Institute of Vaccines&Sera FMBA Russia,
Svoboda str.,52 Krasnoe Selo, Saint-Petersburg, 198320, Russia
e.mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

Key words: viral and microbial antigens, vaccines, immune response, DNA-vaccines

Vaccines are among the most cost-effective drugs that have saved billions of lives throughout the human history.

Immunization has led to the eradication of smallpox, a 3-times reduction in childhood deaths from measles, and the near-eradication of polio in North America and Europe. No wonder vaccination was listed as one of the greatest achievements of the 20th century.

However, even now one in every five children world wide is still not provided with childhood vaccines, which results in estimated 1.5 million childhood deaths each year from common infections such as pneumonia, diarrhea, hepatites and others.

Moreover, scientists have increasingly found infectious agents to be implicated in somatic diseases studied.

To date, effective vaccines have been developed against dozens of bacterial and viral pathogens. However, mass vaccinations pose a number of problems for vaccine manufacturers:

- no culture system supporting replication of some viruses (e.g. hepatites B and C)have been found.
- the existing virus growth substrates do not provide enough antigens to produce vaccines,
- the today's vaccines are not immunologically potent enough to effectively prevent disease.

The latter two problems especially apply to influenza virus which is predicted to cause a pandemic in the coming years.

These basic challenges of vaccine production may be addressed by using gene engineering and cell enzymology techniques that are used to create recombinant vaccines.

One of the first recombinant vaccines is the live attenuated influenza vaccine produced by reassortment. The influenza virus has a fragmented genome, and during the replication of different virus strains within the cell, gene fragments of the virus's key surface proteins, hemagglutinin and neuraminidase, may be exchanged.

The infectious clone technology has been used to create a number of attenuated vaccines including the anti-dengue vaccine. Bivalent virus strains have been obtained which are used to produce a universal vaccine inducing an immune response against all four serotypes of dengue virus.

This provided a platform for ongoing research aiming to create a combined yellow fever and dengue vaccine.

The yellow fever virus, whose genome contains genes encoding surface epitopes of all four types of dengue virus, is used as the vector.

A significant success of genetic engineering in the development of effective vaccines was the creation of a vaccine against hepatitis B. The surface protein gene of this virus (HBsAg) was integrated into yeast cells as part of the plasmid. A producer strain able to synthesize a glycosylated surface antigen was obtained. This recombinant protein became the basis for an effective hepatitis B vaccine, which has been widely used throughout the world for the last two decades.

Currently, research is underway to develop a therapeutic hepatitis B vaccine. A recombinant protein has been created containing the epitopes of the hepatitis B core and surface antigen. Such vaccine is able to inhibit the synthesis of hepatitis B virus in human cells.

The development of therapeutic vaccines depends on the progress in the field of DNA vaccines capable of inducing both cell- and antibody-mediated immune responses.

To date, a number of US companies have started production of therapeutic vaccines against melanoma, colorectal cancer, leukemia, and other types of tumors.

Work is also underway to create vaccines against rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, myasthenia gravis, and allergies.

To enhance the immunological potency of modern vaccines, researchers increasingly use adjuvants activating either the cell-mediated or antibody-mediated immune response. It is important that the addition of such adjuvants to vaccines do not increase the reactogenicity or allergenic potency of the final formulation. To date, there is a number of newly developed adjuvants that are already approved or in the process of being approved for use in vaccines.

.....

УДК 573.6.086.83

СОВРЕМЕННЫЕ ИНФРАСТРУКТУРНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ – ОТ РАЗРАБОТКИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ДО СОЗДАНИЯ МАСТЕР-БАНКА.

Малыгина Т.О.

ООО ОПТЭК, Москва, Россия
105005, РФ, Москва, Денисовский пер., 26.
e-mail: malygina@optecgroup.com

Представлен обзор современных решений для оптимизации процесса поиска новых молекулярных субстанций и разработки процесса биотехнологического производства за счет миниатюризации объема образцов, автоматизации пробоподготовки и анализа и как следствие расширения объема скрининговых исследований без увеличения времени проведения исследований.

Ключевые слова: разработка клеточных линий, оптимизация биотехнологического процесса, скрининг биологической активности молекул.

Биопрепараты наиболее привлекательны для фармацевтической отрасли – они нацелены на лечение наиболее актуальных заболеваний (онко(иммуно)логию, нарушение иммунной системы, инфекционные заболевания), они более успешно проходят клинические заболевания по сравнению с малыми молекулам и их достаточно сложно копировать. Эффективность исследований по разработке биопрепаратов – краеугольный камень успеха, независимо от того, занимаетесь ли Вы созданием биосимиляров, разрабаты-

ваете ли Вы более эффективный продукт по сравнению с уже существующими на рынке или находитесь в поиске инновационных новых формул. Основной залог успеха в этом соревновании – сокращение времени исследований при увеличении скринингового потока.

В данной работе сделан обзор современных решений, позволяющий интенсифицировать поиск без ущерба качеству исследований. Рассматриваемые решения основаны на миниатюризации объемов образца и увеличении за счет этого спектра исследуемых параметров и структур и включают увеличение производительности скрининга на ранних этапах поиска эффективных формул при разработке терапевтических антител, вакцин, генно-инженерных препаратов и препаратов для клеточной терапии, а также методы разработки продуцента, обеспечивающего производство нужного биопрепарата со стабильным качеством с высоким выходом целевого продукта.

UDC 573.6.086.83

ACTUAL INFRASTRUCTURE SOLUTIONS FOR BIOPROCESS DEVELOPMENT – FROM CELL LINE DEVELOPMENT TO MASTER BANK

Malygina T.O.

OPTEC LLC, Moscow, Russia
105005, Russia, Moscow, Denisovskiy per., 26.
e-mail: malygina@optecgroup.com

A review of actual solutions for optimizing the workflow of drug discovery and bioprocess development due to samples miniaturization, sampling and analysis automation and as a result expansion of screening research area without compromising research time has been provided.

Key words: cell line development, bioprocess optimization, biological activity screening.

Biopreparation are most attractive for pharma industry as they target most actual diseases (onco(immunology, immune disorders, infectious diseases), they are more successful in clinical trials as compared with small molecules and it is complex to copy them. Bioproducts development is a race to finish with the most efficacious treatment irrespective of whether you develop biosimilars, biobetters or look for new innovative formulas. Here minimization of the research time alongside with maximization of screening scope is a ticket to success.

Here we provide a review of actual solutions allowing research intensification without compromising its quality. The solutions considered are based on miniaturizing sample volumes allowing increase of the scope of parameters and structures under investigation when developing therapeutic antibodies, vaccines, gene-engineering and cell therapy preparations as well as methods of cell lines development providing the target biopreparation with stable quality and high yield.

УДК 578.5:615

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПЛАТФОРМ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА РЕКОМБИНАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Муха Д. В., Мартынова Е. У.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия
119333, Москва, ул. Губкина, д. 3
e-mail: dmitryVmukha@gmail.com

Исследована структурно-функциональная организация и стратегия экспрессии денсовируса рыжего таракана (BgDV). Показано, что экспрессия капсидных белков BgDV в клетках дрожжей (Saccharomyces cerevisiae) приводит к формированию вирусоподобных частиц (ВПЧ). Получены рекомбинантные ВПЧ, экспонирующие на своей поверхности чужеродные антигенные детерминанты. Обсуждается перспективность использования полученных ВПЧ в качестве вакцинных препаратов и разработки новых методов диагностики инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: Вирусоподобные частицы (ВПЧ), денсовирусы, дрожжи, вакцины, рекомбинантные белки.

Вирусоподобные частицы (ВПЧ), образуются в результате самосборки капсидных белков вирусов. В отличие от вирусов, ВПЧ не содержат генетического материала и являются полностью безопасными. С использованием методов генетической инженерии можно получать «химерные» капсидные белки, к которым присоединен целевой антиген. В результате самосборки таких гибридных белков могут быть получены рекомбинантные ВПЧ, на поверхности которых представлен целевой антиген, или его отдельные эпитопы. В этом случае, ВПЧ могут быть использованы в качестве эффективных вакцинных препаратов. Важным преимуществом вакцинных препаратов, получаемых на основе ВПЧ, является возможность индуцировать не только гуморальный, но и клеточный иммунитет.

К настоящему времени на основе ВПЧ получено несколько десятков эффективных вакцинных препаратов, применяемых в медицинской практике, или находящихся на стадии клинических испытаний. В тоже время, разработка новых типов ВПЧ, которые могут быть использованы в качестве дисплеев для экспозиции на своей поверхности заданных чужеродных антигенных детерминант, остается актуальным. Каждый тип ВПЧ обладает уникальными особенностями и имеет характерные отличия, а именно: степень «аффинности» капсидных белков друг к другу; количество капсидных белков, входящих в состав ВПЧ; протяженность и физико-химические свойства полипептидных последовательностей, которые могут быть экспонированы на поверхности ВПЧ. Кроме того, известно, что самосборка ВПЧ может происходить в различных организмах-хозяевах – от бактерий до культур клеток человека. Выбор экспрессионной системы во многом определяет тип посттрансляционной модификации белкового продукта, что в конечном итоге сказывается на качестве получаемого вакцинного препарата.

В рамках представляемой работы дана характеристика структурно-функциональной организации и стратегии экспрессии денсовируса рыжего таракана. Показано, что капсид этого вируса состоит из трех белков – VP1, VP2 и VP3. Показано, что при экспрессии капсидного белка VP3 в клетках дрожжей происходит формирование ВПЧ. С использованием генно-инженерных подходов получены рекомбинантные ВПЧ, экспонирующие на поверхности заданный чужеродный эпитоп. Отработаны методы очистки изучаемых ВПЧ в препаративных количествах. Методами электронной микроскопии охарактеризована структура формирующихся ВПЧ.

Предполагается, что ВПЧ, получаемые на основе самосборки капсидных белков денсовируса, могут являться перспективной платформой для получения новых вакцинных препаратов и/или разработки новых тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний.

.....

UDC 578.5:615

DESIGN OF NEW PLATFORMS FOR RECOMBINANT PROTEIN AND POLYPEPTIDE BIOSYNTHESIS

D. V. Mukha and E. U. Martynova

Vavilov Institute of General Genetics, Gubkin str. 3, Moscow, 199333 Russia
e-mail: dmitryVmukha@gmail.com

We report a study of structural and functional organization and expression strategy of the German cockroach Blattella germanica densovirus (BgDV). We have demonstrated that BgDV capsid protein expression in yeast (Saccharomyces cerevisiae) results in virus-like particles (VLP) formation. BgDV virus-like particles with foreign antigenic determinants exposed on their surface have been obtained. We discuss the potential of BgDV virus-like particles as vaccines and novel means of diagnostics of infectious diseases.

Key words: virus-like particles (VLP), densoviruses, yeast, vaccines, recombinant proteins.

Virus-like particles (VLPs) are produced by self-assembly of virus capsid proteins. Unlike natural viruses, VLPs do not contain any viral genetic materials and are safe for use. By implementing genetic engineering methods, it is possible to obtain chimeric capsid proteins, which represent a fusion with a target antigen. Self-assembly of such chimeric proteins results in recombinant VLPs which exhibit the target antigen, or its individual epitopes, on their surface. Such recombinant VLPs may be used as potent vaccines. One of the important properties of VLP-based vaccine products is their ability to induce both antibody-mediated and cell-mediated immune responses.

To date, several dozens of vaccine products based on virus-like particles have been developed with some of them having already found use in medicine and others undergoing clinical testing. At the same time, designing new VLP types which could be used to display target foreign antigenic determinants on their surface is still of immediate interest. Each VLP type has its own individual characteristics, such as capsid protein affinity to each other, number of capsid proteins that make up the virus particle, and the size and physical and chemical properties of foreign polypeptide sequences which may be exposed on the particle's surface. Besides that, it is common knowledge that the assembly of virus-like particles may be performed in a broad range of biological systems, from bacteria to human cell cultures. The expression system used largely determines the post-translation modifications which may undergo the recombinant protein, which in its turn has substantial impact on the quality of the obtained vaccine product.

The work presented here was aimed at studying the structural and functional organization of the German cockroach densovirus (BgDV) and the expression strategy of its genome. We have found that BgDV capsid is made up by three proteins, VP1, VP2, and VP3. We have demonstrated that VP3 capsid protein expression in yeast results in the corresponding VLP assembly. Using genetic engineering techniques, we obtained recombinant BgDV VLPs exposing a desired foreign epitope. The techniques for preparative purification of the obtained VLPs have been optimized. The structure of the produced virus-like particles was described using electron microscopy.

We believe that virus-like particles obtained by self-assembly of the densovirus capsid proteins may be a promising platform for new vaccine products development and/or for the design of novel testing systems for infectious diseases diagnostics.

УДК 544.7

СВЕРХКРИТИЧЕСКИЕ ФЛЮИДЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ И СТЕРИЛИЗАЦИИ ФАРМПРЕПАРАТОВ, МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ И МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Паренаго О.О.

Институт общей и неорганической химии РАН, Москва, Россия
Москва, Ленинский проспект, д.31
e-mail: oparenago@scf-tp.ru

В обзорном докладе освещены возможности использования сверхкритических флюидных технологий для очистки и стерилизации фармпрепаратов, медицинских инструментов, изделий и биотканей с использованием диоксида углерода в качестве флюидного растворителя.

Ключевые слова: сверхкритический диоксид углерода, очистка биотканей и материалов, материалы для регенеративной медицины.

Сверхкритические флюидные технологии с использованием диоксида углерода в качестве флюида применяются для очистки, в частности делипидизации, и стерилизации различных материалов и изделий достаточно давно, около 20 лет. Несомненными преимуществами данной технологии является экологичность, возможность проводить обработку при сравнительно низкой температуре – 35-40° С. Однако в последние годы появилось множество работ описывающих новые подходы к процессам очистки и стерилизации, данные по оптимизации процессов, возможности использования более широкого спектра сверхкритических сред, исследования по механизмам процессов очистки и стерилизации, а также значительное расширение областей применения.

В докладе рассматриваются основные свойства сверхкритического диоксида углерода, которые лежат в основе использования его в качестве растворителя и стерилизующего агента, описываются возможные добавки к СК CO2 для увеличения эффективности процессов очистки. Рассматриваются некоторые технические особенности систем очистки и стерилизации, Приводятся примеры возможных областей использования СК технологий очистки и объектов, для очистки которых СК технологии являются во многом уникальными. Приводятся примеры промышленного использования технологий в мире и в России.

UDC 544.7

SUPERCRITICAL FLUIDS FOR CLEANING AND STERILIZATION OF PHARMACEUTICALS AND MATERIALS FOR REGENERATIVE MEDICINE AND MEDICAL DEVICES.

Parenago O.O.

Kurnakov Institute of general and inorganic chemistry of RAS
Moscow, Leninsky prospect, 3
e-mail: oparenago@scf-tp.ru

In the overview report highlights the possibility of using supercritical fluid technology for cleaning and sterilization of pharmaceuticals, medical instruments, products and biological tissues with the use of carbon dioxide as the fluid diluent.

Key words: supercritical carbon dioxide, purification of tissues and materials, materials for regenerative medicine.

Supercritical fluid technology using carbon dioxide as fluid used for cleaning, in particular of delipidization, and sterilization of various materials and products quite a long time, about 20 years. Undoubted advantages of this technology is environmental friendliness, the ability to conduct the treatment at relatively low temperature of 35-40O C. However, in recent years there have been many works describing new approaches to the processes of cleaning and sterilization, data on optimization of processes, the possibility of using a wider range of supercritical environments, research on the mechanisms of the processes of cleaning and sterilization, as well as a significant expansion of the application areas.

The report discusses the main properties of supercritical carbon dioxide, which are the basis of its use as a solvent and sterilizing agent, describes the possible additives to SC CO2 to increase the efficiency of cleaning processes. Discuss some of the technical features of systems of cleaning and sterilization, examples of possible applications of IC technologies for treatment and clean the IC technology is unique in many ways. Examples of industrial use of the technology in the world and in Russia.

.....

УДК 57.085.23

ТРЁХМЕРНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ОДНОРАЗОВЫХ БИОРЕАКТОРАХ

Волкова И.М.

ООО «Сарториус Стедим РУС», 199155, г. Санкт-Петербург, ул. Уральская, д. 4, лит. Б.
e-mail: Irina.Volkova@Sartorius.com

Культивирование клеток млекопитающих в трёхмерных условиях становится приоритетным в многочисленных биомедицинских и биотехнологических приложениях. В частности, при исследовании нормальной физиологии и биохимии клеток, тестировании разнообразных химических соединений, лекарственных препаратов, пищевых добавок, выращивании искусственных тканей, органов, синтезе ценных биологических веществ, токсикологическом тестировании (в качестве заменителя тестирования на животных), для получения большого количества клеточной биомассы для клеточной терапии.

Одним из наиболее перспективных клеточных типов, которые используются для этих целей, являются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), первоначально обнаруженные в строме костного мозга (КМ) [1], были затем найдены в других органах: плаценте, пуповине, печени и жировой ткани (ЖТ). ММСК способны при индукции формировать мезодермальные клеточные популяции, из которых в ходе эмбрионального развития образуются костно-хрящевая ткань, строма КМ, мышцы, ЖТ и сухожилия [2]. Другим преимуществом данных стволовых клеток (СК), объясняющим их широкое применение в клеточной терапии, является очень низкая иммуногенность, что обеспечивает возможность пересадки клеток от любого неродственного донора любому реципиенту без использования иммуносупрессивной терапии [3]. Кроме того, ММСК обладают иммуносупрессивными свойствами против Т-клеток, что делает эти клетки эффективными терапевтическими агентами при лечении больных с остро выраженной реакцией отторжения трансплантированной ткани по причине тканевой несовместимости. Благодаря вышепере-

численным свойствам, ММСК нашли применение в клеточной терапии широкого круга патологий, включая сердечно-сосудистые заболевания, инсульт, остеоартрит, несовершенный остеогенез, фиброз печени и др.

Для перевода адгезивных культур клеток, к которым относятся ММСК, в 3D состояние используется прием, основанный на культивировании клеток на матриксах-носителях. В связи с этим выбор матриксов - первый ключевой этап для формирования 3D культур клеток. Основными критериями биологически совместимого матрикса для 3D культивирования ММСК должны быть: отсутствие цитотоксичности, поддержание адгезии, фиксации, дифференцировки или предотвращение дедифференцировки помещенных на её поверхность клеток, отсутствие воспалительной реакции на материал и иммунного ответа, достаточная механическая прочность в соответствии с назначением, биорезорбируемость обычными метаболическими путями [4].

Выбор биореактора для наших целей - задача сложная. Оптимальным решением является использование волновых платформ (Biostat® Cultibag RM, Sartorius) с одноразовыми пластиковыми мешками различного объема. Технология качания использует механическую энергию для обеспечения равномерного перемешивания с наименьшим механическим воздействием на клетки. Интенсивность перемешивания зависит от скорости качания CultiBag RM и угла наклона платформы, создается интенсивное движение жидкости в одноразовом мешке. Таким образом, поверхность среды постоянно обновляется благодаря массообмену между свободным пространством и жидкостью. Одноразовые мешки снижают затраты времени и средств на валидацию технологического процесса. Благодаря проведенным исследованиям экстрагируемых и выщелачиваемых веществ, отсутствию необходимости очистки и стерилизации мешков, обеспечивается более комфортный процесс культивирования, а главное, что Biostat® Cultibag RM идеально подходит для использования в условиях GMP.

Литература:

1. *Волкова И.М., Викторова Е.В., Савченкова И.П. и соавт. Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота. Сельскохозяйственная биология. 2012; 2: 32-8.*
2. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284: 143-7.*
3. *Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 2003; 5(6): 485-9.*
4. *Coutu D.L., Yousefi A. M., Galipeau J. Three-dimensional porous scaffolds at the crossroads of tissue engineering and cell-based gene therapy. Review. J Cell Biochem. 2009; 108(3): 537-46.*

.....

UDC 57.085.23

THREE-DIMENSIONAL CULTIVATION OF MAMMALIAN CELLS IN SINGLE-USE BIOREACTORS

Volkova I. M.

LLC "Sartorius Stedim RUS", 199155, St. Petersburg, House 4, Letter Б, Uralskaya street
e-mail: Irina.Volkova@Sartorius.com

Cultivation of mammalian cells in three-dimensional terms is becoming a priority in many biomedical and biotechnological applications. In particular, the study of normal physiology and biochemistry of the cell, testing a variety of chemical compounds, drugs, food additives, the cultivation of artificial tissues, organs, biosynthesis of biological substances, toxicological testing (as a substitute for animal testing) and to produce large amounts of cell biomass for cell therapy.

One of the most perspective cell types, which are used for these purposes, are multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC), originally found in the bone marrow stroma [1] (BM) were later found in other organs: placenta, umbilical cord, liver and adipose tissue (AT). During the differentiation MMSC are able to shape mesodermal cell populations from which bone and cartilage tissue, BM stroma, muscles, AT and tendons are formed during the embryonic development [2-3]. Another advantage of these stem cells (SC), explaining their widespread usage in cell therapy, is very low immunogenicity. It allows transplanting these cells from any unrelated donor to any recipient without immunosuppressive therapy [4]. Moreover MMSC have immunosuppressive properties against T-cells [5], which makes these cells the effective therapeutic agents for the treatment of patients with severe acute rejection of the transplanted tissue due to tissue incompatibility. Due to the above properties, MMSC are used in the cell therapy of a wide range of pathologies, including cardiovascular disease, stroke, osteoarthritis, osteogenesis imperfecta,

liver fibrosis and others.

The transformation of adherent cell cultures, for example, MMSC, in three-dimensional (3D) term is carried out by seeding cells on scaffolds. The choice of scaffolds is the first key step for forming 3D cell cultures. The main criteria for biocompatible scaffolds should be: lack of cytotoxicity, maintaining adhesion, fixation, differentiation or prevent dedifferentiation of the adherent cells, absence of inflammatory reactions for the material and immune response, sufficient mechanical strength in accordance with the purpose, bioresorbable by normal metabolic ways [6].

The choice of the bioreactor for our purposes is a difficult task. The best solution is using the wave platforms (Biostat® Cultibag RM, Sartorius) with single-use plastic bags of various sizes. The rocking technology utilizes mechanical energy to ensure homogeneous mixing with low shear. Energy input is affected by rocking the CultiBag RM back and forth, generating a fluid movement in the cell culture medium. In this way the surface of the medium is continuously renewed enabling mass transfer between the headspace and the medium. Single-use bags reduce validation costs; remove the need for cleaning, sterilizing, and provide stress free convenience culturing. With the available comprehensive validation guide and extractable analysis, in conjunction with full qualification and validation support including FAT and SAT, the Biostat® CultiBag RM is perfectly suited for use in a GMP regulated environment.

References:
1. *Volkova I.M., Victorova E.V., Savchenkova I.P. et. al. Characteristic of mesenchymal stem cells, isolated form bovine bone marrow and adipose tissue. Agriculture Biology. 2012; 2: 32-8.*
2. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284: 143-7.*
3. *Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 2003; 5(6): 485-9.*
4. *Coutu D.L., Yousefi A. M., Galipeau J. Three-dimensional porous scaffolds at the crossroads of tissue engineering and cell-based gene therapy. Review. J Cell Biochem. 2009; 108(3): 537-46.*

.....

УДК 573.6.086.83

КРИОБАНК КАК АТРИБУТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ИНФРАСТРУКТУРЫ

Сазанов А.А.[1], Ерганоков Х.Х.[2], Pfeifer E.[3]

[1] Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Россия, 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26
e-mail: alexei.sazanov@technolog.edu.ru
[2] ООО Криотек, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 38
e-mail: kh.erganokov@cryotec.ru
[3] ASKION GmbH, Gewerbepark Keplerstraße 17-19, 07549, Gera, Германия
e-mail: info@askion.com

Показана целесообразность применения роботизированных герметичных криохранилищ ASKION HS200S и герметичного криогенного модуля WorkBench технологии обработки и замораживания образцов в контролируемой влажностной и температурной среде.

Ключевые слова: биобанки; криобанки; аннотирование; контроль условий хранения; жизнеспособность клеток; сохранность биологических молекул.

Биобанки представляют собой систематизированные и аннотированные коллекции биологических образцов, имеющие систему СОП – стандартных операционных процедур - и соответствующие рекомендациям ISBER - Международного общества биологических и экологических репозиториев. Определяющее значение в деятельности биобанка имеет стандартизация условий получения, обработки, хранения и предоставления образцов конечному пользователю. Атрибутами биобанка являются общие принципы маркирования и аннотирования биологических образцов с использованием специализированного ПО, автоматизированные системы контроля условий их хранения и учета. Криобанки представляют собой биобанки с наличием условий хранения от -196°C до -150°C, что позволяют обеспечить лучшую жизнеспособность клеток и наибольшую сохранность биологических молекул. Криобанкирование являются наиболее существенной частью инфраструктуры персонализованной и популяционной медицины, фармацевтики и биофармакологии, сохранения редких и исчезающих видов, биотехнологий в целом.

С учетом изложенного выше, компания Криотек предлагает следующие комплексное решение со все-

сторонним биологическим и техническим консультированием для создания криобанков de novo - криобанк «под ключ» от Криотек (Россия) и Askion (Германия) на базе нового класса роботизированных герметичных криохранилищ ASKION HS200S для длительного хранения биообразцов в парах жидкого азота при температуре ниже -150°C, герметичного криогенного модуля WorkBench для подготовки образцов и их программной заморозки с последующей отправкой контейнера с замороженными образцами на хранение с помощью автоматического модуля TransferStation и внешней автоматизации ExKra - KryoCell, которая может связать в единую систему требуемое число криохранилищ, а также системы контроля и управления ASKION C-line control и Syntesy cryo.trace.

Криогенный рабочий модуль WorkBench WB220 позволяет проводить обработку, сортировку и подготовку образцов в контролируемой среде при температуре ≤ -110°C, последующую заморозку образцов с помощью нового типа программного криозамораживателя с лифтовым механизмом поддержания температурной кривой заморозки в герметичных условиях. Гибкие индивидуальные программы замораживания образцов с учетом их объема и физико-химических свойств позволяют обеспечить лучшую жизнеспособность клеток и наибольшую сохранность биологических молекул.

Проведены исследования влияния условий долговременного хранения образцов на жизнеспособность микроваскулярных эндотелиальных клеток человека. Убедительно доказана целесообразность применения технологии обработки и замораживания образцов в контролируемой влажностной и температурной среде с использованием рабочего модуля Askion WorkBench WB220.

UDC 573.6.086.83

CRYOBANKS AS THE ATTRIBUTES OF A BIOTECHNOLOGICAL INFRASTRUCTURE

Sazanov A.A.[1], Erganokov Kh.Kh.[2], Pfeifer E.[3]

[1] Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University)
Moskovsky prospect 26, Saint-Petersburg, 190013, Russia
e-mail: alexei.sazanov@technolog.edu.ru
[2] Cryotec LLC, Vavilova street 38, Moscow, 119991, Russia
e-mail: kh.erganokov@cryotec.ru
[3] ASKION GmbH, Gewerbepark Keplerstraße 17-19, 07549, Gera, Germany
e-mail: info@askion.com

The advantages of application of the robotic hermetic cryostorage ASKION HS200S and the hermetic cryogenic module WorkBench in processing and freezing of samples in controlled temperature and humid conditions are shown.

Key words: biobanks; cryobanks; annotation; monitoring of storage conditions; cell viability; preservation of biological molecules.

Biobanks are systematic and annotated collections of biological samples with a system of SOP - standard operating procedures - and the corresponding to the recommendations of the ISBER - the International Society for Biological and Environmental Repositories. Crucial in the activities of biobank is standardization of conditions of obtaining, processing, storage of samples and providing end user them with. The attributes of biobanks are common principles of labeling and annotation of biological samples using specialized software, automated monitoring system of the storage condition and the biosamples registration. Cryobanks are the biobanks with the presence of the storage conditions from -196 ° C to -150 ° C, that allows to provide better cell viability and highest preservation of the biological molecules. Cryobanking is the most essential part of the infrastructure of population and personalized medicine, pharmaceuticals and biopharmacology, conservation of rare and endangered species, biotechnology in general.

Taking into consideration the above, the Cryotec LLC offers the following integrated design solution with a comprehensive biological and technical consulting for creation of cryobanks in biotechnology de novo - "Cryobank turnkey" from Cryotec LLC (Russia) and Askion (Germany) on the basis of a new class of robotic hermetic cryostorages ASKION HS200S for long term storage of biological samples in the vapor phase of liquid nitrogen at a temperature below -150 °C, hermetic cryogenic modules WorkBench for sample preparation and controlled rate freezing and subsequent delivering of the container with frozen samples to the storage area with the module TransferStation and

external automation ExKra - KryoCell, which allow to integrate the required number of cryostorages into one system, and the monitoring and control systems ASKION C-line control and Syntesy cryo.trace.

Cryogenic operating module WorkBench WB220 enables handling, sorting and preparation of samples in the controlled environment at a temperature ≤ -110 ° C, the subsequent freezing of the samples using a new type of the controlled rate freezer with elevator mechanism for maintaining the temperature curve of freezing at hermetic conditions. Flexible individual freezing programs depending on the biosample volume and physical and chemical properties allow to provide a better cell viability and highest safety of the biological molecules.

The investigations of the influence of the conditions of long-term storage on the viability of the human microvascular endothelial cells strongly confirmed advantages of application of the technology of processing and freezing samples in a controlled temperature and humidity conditions using the Askion WorkBench WB220.

МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНАЯ ОПТОАКУСТИЧЕСКАЯ ТОМОГРАФИЯ МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ – ИННОВАЦИОННЫЙ МЕТОД ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ

Киселевский М.В., Лютынский В.В., Гробер Н.А.

[1] *ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, Москва, Россия 115478, Москва, Каширское ш., 23*
[2] *ООО «Альгимед», Москва, Россия*
121596, г. Москва, ул. Говорова 16/6

Мультиспектральная оптоакустическая томография (МСОТ) является новым методом оптической биомедицинской визуализации в режиме реального времени, обеспечивающим возможность неинвазивного исследования анатомических особенностей и функционального состояния органов и тканей экспериментальных животных. Визуализация физиологических и молекулярных маркеров с использованием оптоакустики имеет большой потенциал и дает значительно большие возможности для прижизненного исследования глубоких слоев тканей по сравнению с традиционными методами исследований.

Ключевые слова: мультиспектральная оптоакустическая томография, мелкие лабораторные животные, ткани, органы, маркеры, визуализация, исследования лекарственных препаратов, оксигенация

Метод мультиспектральной оптоакустической томографии дает возможность отображать эндогенные хромофоры (липиды и меланин), а также оценить состояние оксигенации органов за счет визуализации соотношения окси-/дезоксигемоглобин (рис.1). Экзогенные контрастные агенты, такие как небольшие молекулы красителей, например индоцианин зеленый, флуоресцентные белки или наночастицы также могут быть визуализированы с использованием МСОТ [3].

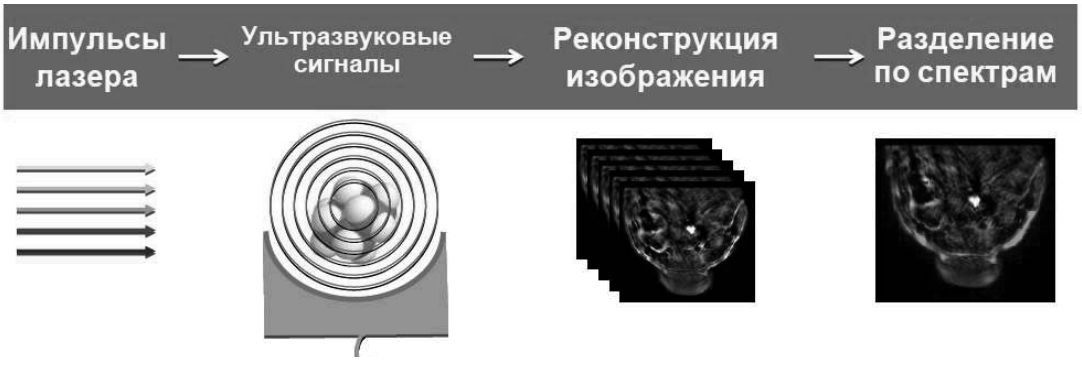
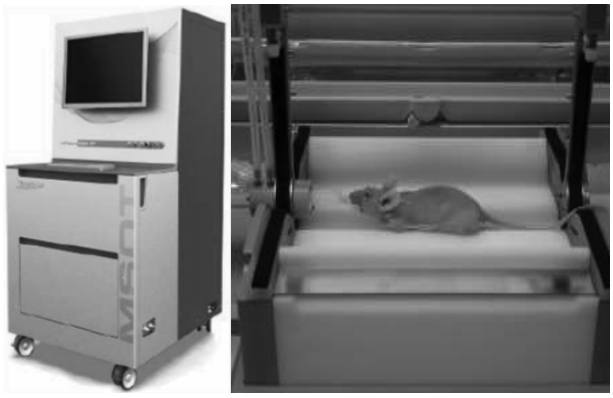


Рисунок 1. *Принцип формирования оптоакустического изображения*

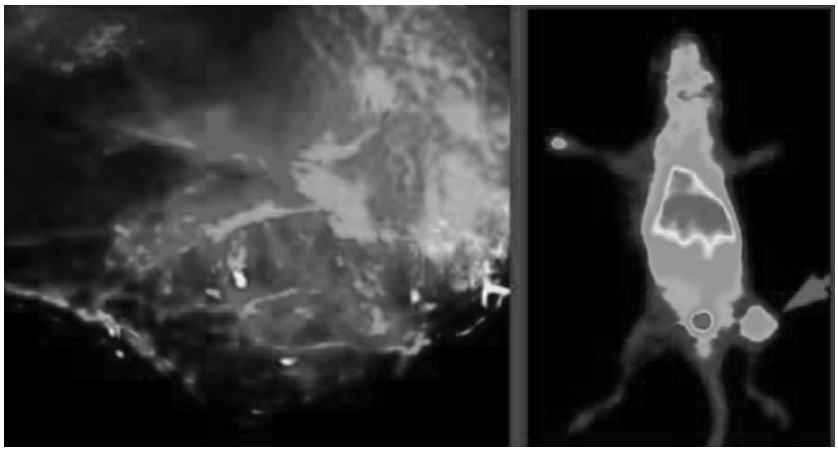
Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что МСОТ успешно используется в экспериментальных исследованиях с использованием мелких лабораторных животных на моделях различных патологических состояний. За последнее десятилетие МСОТ применяли для визуализации сосудистого контраста, поражения головного мозга, функциональных нарушений гемодинамики, а также изменения потребления кислорода в ткани опухоли [4].



А Б

Рисунок 2. *Сканер для мелких лабораторных животных (А), фиксации мыши для помещения в водную камеру сканера (Б).*

Также одним из перспективных направлений применения МСОТ является доклинические исследования новых лекарственных препаратов и медицинских изделий [3]. Этот метод позволяет проводить динамический неинвазивный контроль за состоянием органов и тканей и биораспределением лекарственных препаратов, оценивать биосовместимость погружных медицинских изделий за счет детектирования воспалительных процессов и треккинга иммунных клеток [2]. Во время сканирования наркотизированное экспериментальное животное помещается в защитную пленку и погружается в водную камеру сканера (рис. 2), при этом осуществляется мониторинг кардиоваскулярных показателей. Наибольшее количество исследований в данной области посвящено экспериментальной опухолевой модели. МСОТ позволяет не только визуализировать первичный опухолевый узел, но оценить состояние его оксигенации, выявить зоны гипоксии, а, при использовании дополнительных маркеров, оценить наличие явления апоптоза в различных областях опухолевого узла (рис. 3 а). Важной функций МСОТ для проведения доклинических исследований является неинвазивное исследования фармакокинетики препаратов (рис. 3 б) [4].



А Б

Рисунок 3. *3D изображение особенностей оксигенации первичного опухолевого узла (А), биораспределение гемцитабинома в организме мыши (Б) – накопление наночастиц дендримера олигоэтиленгликоля , конъюгированного с гемцитабином.*

При проведении доклинических исследований необходимо оценить токсические свойства препарата или медицинского изделия, для этого наряду с функциональными тестами используется посмертное гистологическое исследование. МСОТ позволяет производить прижизненный мониторинг функции основных паренхиматозных органов.

Таким образом, МСОТ позволяет сократить в несколько раз количество лабораторных животных, ускорить сроки выведения препаратов на рынок, проводить значительно более информативные неинвазивные исследования, исключить ошибки из-за жесткого излучения рентгеновских методов исследования.

Литература:

1. Deliolanis NC1, Ale A, Morscher S, Burton NC, Schaefer K Deep-tissue reporter-gene imaging with fluorescence and

optoacoustic tomography: a performance overview Mol Imaging Biol. 2014 Oct;16(5):652-60
2. *Nam-Young Kang, Sung-Jin Park, Xiao Wei Emmiline Ang A macrophage uptaking near-infrared chemical probe CDnir7 for in vivo imaging of inflammation, Chem Comm Jun 25;50(50):6589-91*
3. *Takahiro Kuchimaru, Tetsuya Kadonosono, Shotaro Tanaka, In Vivo Imaging of HIF-Active Tumors by an Oxygen-Dependent Degradation Protein Probe with an Interchangeable Labeling System PLoS One. 2010; 5(12): e15736*
4. *Wu W, Driessen W, Jiang X. Oligo(ethylene glycol)-based thermosensitive dendrimers and their tumor accumulation and penetration J Am Chem Soc. 2014 Feb 26;136(8):3145*

MULTISPECTRAL OPTOACOUSTIC TOMOGRAPHY OF SMALL LABORATORY ANIMALS IS INNOVATIVE METHOD OF NON-INVASIVE PRECLINICAL EVALUATION

Kiselevsiky M.V., Lutynskij V.V., Grober N.A.

[1] *N.N.Blokhin Russian cancer Research Center of Russian Ministry of Health, Moscow, Russia*
115478, Moscow, Kashirskoye Rte., 23
[2] *Algimed Ltd, Moscow, Russia*
121596, Moscow, Govorova Str, 16/6

Multispectral optoacoustic tomography (MSOT) is an emerging real-time optical biomedical imaging technique, which provides a noninvasive, high resolution, intrinsic or contrast-enhanced, anatomical, functional and metabolic tomographic imaging at several centimeters of tissue depth. A visualization of endogenous or exogenous reporter agents, such as fluorescent proteins and pharmacological probes allows to extend this method for studying of molecular mechanisms. Combining visualization of physiological and molecular markers using optoacoustics has great potential and provides significantly greater opportunities for in vivo studies of deep layers of tissue compared to routine research methods.

Key words: Multispectral optoacoustic tomography, laboratory animals, tissues, organs, markers, visualization, drug research, oxygenation

This method allows to visualize the endogenous chomofory (lipids and melanin), as well as to evaluate the state of organsoxygenation by visualizing the ratio of oxy / deoxyhemoglobin (Fig.1). Exogenous contrast agents are small molecules such as dyes, for example in docyanine green, fluorescent proteins or nanoparticles may also be visualized using MSOT [3].

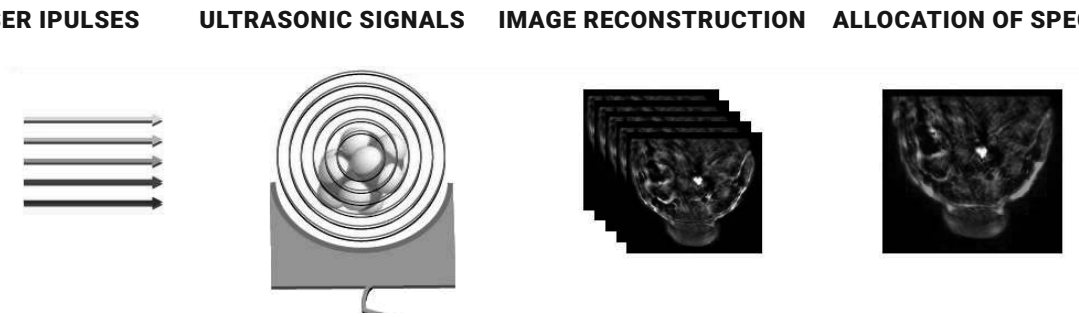
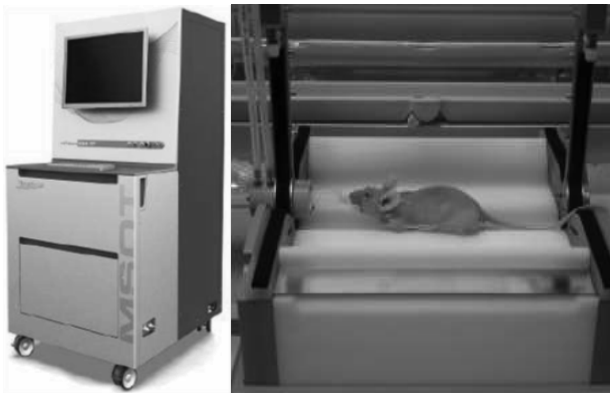


Figure 1. *The principle of photoacoustic image formation*

Currently data indicates, that MSOT is successfully used in experimental studies, using small laboratory animal models for various pathological states. Over the past decade, MSOT used for visualization of the vascular contrast, brain injury, functional disorders of hemodynamics, as well as changes in oxygenation of the tumor tissue [4].



A B

Figure 2. *Scanner for small laboratory animal (A) fixing a mouse to place the scanner water chamber (B).*

One of the most perspective areas of application of MSOT is a preclinical studies of new drugs and medical devices [3]. This method allows non-invasive monitoring of the organs and tissues condition and biodistribution of drugs, to evaluate the biocompatibility of medical devices submerged due to the detection of inflammatory and immune cells tracking [2]. During scanning, anesthetized experimental animal is placed in a protective film and is immersed in an aqueous scanner camera (Fig. 2) with monitoring of cardiovascular parameters. The greatest number of studies in this area is devoted to an experimental tumor model. MSOT allows not only to visualize the primary tumor site, but to assess the state of its oxygenation, to identify areas of hypoxia, and using additional markers to evaluate the presence of the apoptosis phenomenon in various areas of the tumor site (Fig. 3a). One of the important function of MSOT for non-invasive preclinical research is possibility of studying of drugs (Fig. 3b) [4].

А Б

Figure 3. A 3D image of features of oxygenation in primary tumor node (A), gemtsitabinoma biodistribution in a mouse body (B) - the accumulation of Oligo(ethylene glycol)-based thermosensitive dendrimers nanoparticles conjugated with gemcitabine

During pre-clinical studies it's necessary to evaluate a toxic properties of drug or medical device. For this, it uses post-mortem histological analysis along with functional tests. MSOT allows a lifetime monitoring of functions of the main parenchymal organs.

Thus, using of MSOT technology can help to reduce the number of laboratory animals by several times, accelerate the launch dates of drugs on the market, carry out a much more informative non-invasive researches, eliminating errors due to hard radiation of X-ray methods.

References:

1. *Deliolanis NC1, Ale A, Morscher S, Burton NC, Schaefer K Deep-tissue reporter-gene imaging with fluorescence and optoacoustic tomography: a performance overview Mol Imaging Biol. 2014 Oct;16(5):652-60*
2. *Nam-Young Kang, Sung-Jin Park, Xiao Wei Emmiline Ang A macrophage uptaking near-infrared chemical probe CDnir7 for in vivo imaging of inflammation, Chem Comm Jun 25;50(50):6589-91*
3. *Takahiro Kuchimaru, Tetsuya Kadonosono, Shotaro Tanaka, In Vivo Imaging of HIF-Active Tumors by an Oxygen-Dependent Degradation Protein Probe with an Interchangeable Labeling System PLoS One. 2010; 5(12): e15736*
4. *Wu W, Driessen W, Jiang X. Oligo(ethylene glycol)-based thermosensitive dendrimers and their tumor accumulation and penetration J Am Chem Soc. 2014 Feb 26;136(8):3145*

УДК 544.77, 53.047, 615.034, 616.5

БИОСОМЕСТИМЫЕ ПОРИСТЫЕ СУБМИКРОННЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Свенская Ю.И., Генина Э.А., Терентюк Г.С., Горин Д.А., Утц С.Р., Сухоруков Г.Б., Тучин В.В.

Саратовский Национальный Исследовательский Государственный Университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83
e-mail: svenskaya@info.sgu.ru

Предложен способ неинвазивной доставки биологически активных веществ in vivo в и через придатки кожи, включающий применение матриц-носителей на основе пористых частиц карбоната кальция. Продемонстрирована возможность эффективного глубокого заполнения волосяных фолликулов предлагаемыми контейнерами, содержащими биологически активное вещество. Предлагается применение данной методики для осуществления идеи пролонгированной доставки лекарственных веществ.

Ключевые слова: субмикронные частицы, пористые частицы, трансдермальная доставка, волосяной фолликул, адресная доставка лекарств.

Предлагаемое исследование нацелено на разработку метода доставки биологически активных веществ через придатки кожи (волосяные фолликулы и воронки, протоки сальной и потовой желез), играющие большую роль в трансдермальной транспортировке веществ. Пространство сально-волосяного фолликула служит резервуаром для хранения БАВ, обеспечивая доступ к стволовым и иммунным клеткам, а также к сети кровеносных сосудов, примыкающих к корню луковицы, в результате его проникновения в прилегающие к фолликулу области за счет диффузии [1, 2]. Таким образом открывается возможность локализации терапевтического воздействия лекарственного препарата при лечении таких патологий, как, например, алопеция, акне и ветилиго, а кроме того становится возможной пролонгированная системная доставка БАВ. Предлагается применение субмикронных пористых частиц карбоната кальция в качестве матрицы-носителя БАВ для реализации идеи доставки в пространство волосяного фолликула. Продемонстрирована возможность эффективного глубокого заполнения волосяных фолликулов предлагаемыми контейнерами. Данные частицы обладают пористой структурой, а также рядом таких достоинств, как биосовместимость, простота приготовления, низкая себестоимость [3]. Путем изменения значения pH среды можно добиться растворения частиц карбоната кальция, что обеспечит высвобождение иммобилизованного в них препарата [4, 5]. Возможность использования таких контейнеров для инкапсуляции лекарственных средств обусловлена низкой цитотоксичностью карбоната кальция и отсутствием его влияния на жизнеспособность клеточных культур [6, 7]. Таким образом, применении пористых частиц карбоната кальция в качестве биодеградируемых матриц-носителей для трансдермальной доставки обеспечивает инкапсуляцию активного вещества с возможностью его последующего высвобождения в волосяных фолликулах и протоках сальной и потовой желез.

Исследование осуществлено в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор №14.Z50.31.0004 от 4 марта 2014).

Литература:

1. *Knorr F. et al. Follicular transport route–research progress and future perspectives// European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009. Vol. 71. № 2. P. 173-180.*
2. *Meidan V.M., Bonner M.C., Michniak B.B. Transfollicular drug delivery—is it a reality? // International journal of pharmaceutics. 2005. Vol. 306. № 1. P. 1-14.*
3. *Volodkin D.V. et al. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation// Langmuir. 2004. Vol. 20. № 8. P. 3398-3406.*
4. *Parakhonskiy B.V., Haase A., Antolini R. Sub-Micrometer Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release// Angewandte Chemie International Edition. 2012. Vol. 51. № 5. P. 1195-1197.*
5. *Svenskaya Y. et al. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer// Biophysical chemistry. 2013. Vol. 182. P. 11-15.*
6. *Parakhonskiy B. V. et al. Tailored intracellular delivery via a crystal phase transition in 400 nm vaterite particles// Biomaterials Science. 2013. Vol. 1. № 12. P. 1273-1281.*
7. *Svenskaya Y.I. et al. Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite*

submicron particles// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016. Vol. 146. P. 171–179.

UDC 544.77, 53.047, 615.034, 616.5

POROUS BIODEGRADABLE SUBMICRON PARTICLES FOR EFFICIENT FOLLICULAR DRUG DELIVERY

Svenskaya Yu.I., Genina E.A., Terentyuk G.S., Gorin D.A., Utz S.R., Sukhorukov G.B., Tuchin V.V.

Saratov State University, Saratov, Russia
410012, Astrakhanskaya street 83, Saratov, Russia
e-mail: svenskaya@info.sgu.ru

Porous calcium carbonate submicron carriers were used for the drug transportation into hair follicles. A deep penetration of the particles along with plentiful follicle filling was demonstrated. The reporting study opens up the possibility of non-invasive transdermal drug delivery.

Key words: submicron particles, porous particles, transdermal drug delivery, hair follicles, targeted drug delivery.

The reporting study aimed at developing a protocol for transfollicular drug delivery. Hair follicles exhibit an important reservoir for topically applied substances [1]. A dense capillary network ensures the systemic uptake of delivered drug. In addition, different target regions of the follicle are the sites of interest for regenerative medicine, immunomodulation and aetiology of androgenetic alopecia, acne and other sebaceous gland dysfunctions [2]. Porous calcium carbonate submicron carriers were used for the drug transportation into hair follicles. A deep penetration of the particles along with plentiful follicle filling was demonstrated. Porous calcium carbonate particles are biocompatible, pH-sensitive (owning to ability of decomposition at pH bellow 6.5) carriers with a large surface area, high drug payload ability [3, 4, 5, 6]. By this means, such a particulate carrier system allows transportation and storage of the encapsulated drug while penetrating into the hair follicle. A pH-dependent and recrystallization-driven release of a payload from the delivered carriers provides a transdermal drug penetration.

The study was supported by Government of the Russian Federation (grant № 14.Z50.31.0004 to support scientific research projects implemented under the supervision of leading scientists at Russian institutions and Russian institutions of higher education).

References:

1. *Knorr F. et al. Follicular transport route–research progress and future perspectives// European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009. Vol. 71. № 2. P. 173-180.*
2. *Meidan V.M., Bonner M.C., Michniak B.B. Transfollicular drug delivery—is it a reality? // International journal of pharmaceutics. 2005. Vol. 306. № 1. P. 1-14.*
3. *Volodkin D.V. et al. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation// Langmuir. 2004. Vol. 20. № 8. P. 3398-3406.*
4. *Parakhonskiy B.V., Haase A., Antolini R. Sub-Micrometer Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release// Angewandte Chemie International Edition. 2012. Vol. 51. № 5. P. 1195-1197.*
5. *Svenskaya Y. et al. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer// Biophysical chemistry. 2013. Vol. 182. P. 11-15.*
6. *Parakhonskiy B. V. et al. Tailored intracellular delivery via a crystal phase transition in 400 nm vaterite particles// Biomaterials Science. 2013. Vol. 1. № 12. P. 1273-1281.*
7. *Svenskaya Y.I. et al. Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016. Vol. 146. P. 171–179.*

ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Г.А.Пьявченко[1,2], Л.Багдасарян[3]; Р.Бултуис[3]; В.И.Ноздрин[1,2]

[1] ЗАО «Ретиноиды», Центр доклинических исследований, Россия, Москва, ул. Плеханова, д.4
[2] ФГБОУ ВО«Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», Медицинский институт, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Россия, Орел, ул. Октябрьская, д.25

[3] *Metris B.V., Нидерланды, 2132 NG Hoofddorp, Kruisweg 829c*

Современные тенденции развития фармакологической науки требуют достаточно высокого уровня качества результатов доклинических исследований. Для достижения этой цели в экспериментах на лабораторных животных необходимо осуществлять комплексную оценку воздействия лекарственного средства. В частности, необходимо оценивать морфологическое и физиологическое состояние организма, а самих животных содержать в контролируемых условиях. Российской фармацевтической наукой взят курс на соблюдение принципов надлежащей лабораторной практики. При этом морфологическая оценка действия препарата заключается в изучении изменений структуры органов и тканей. Такие способы оценки воздействия препарата отражают лишь структурные изменения, и не дают возможности оценить функциональную реакцию от его применения in vivo. При оценке физиологического действия субстанции на животных необходимо учитывать функциональную реакцию организма. Одним из самых доступных для этой цели является тест «открытое поле». Однако его применение сопряжено с наличием ряда недостатков, таких как субъективность и низкая достоверность данных. Этих недостатков лишены аппаратно-программные комплексы, способные в автоматическом режиме производить сбор изучаемых параметров (поведенческие реакции, физиологические показатели и ультразвуковые вокализации лабораторных животных), и осуществлять их анализ, хранение и защиту. В практике исследовательских лабораторий используются приборы Laboras (оценка поведенческих реакций – двигательная активность, прием пищи и питья, сон, груминг, замирания, стойки и др.), Sonotrack (оценка ультразвуковых вокализаций – количество криков, их продолжительность, частота и др.) и DSI (телеметрическая оценка физиологических показателей). В случае использования одновременной записи всех параметров на нескольких приборах, подключенных к одному компьютеру, появляется возможность оценки одного и того же зарегистрированного несколькими системами акта, что позволяет проводить функциональную оценку воздействия препарата и оперировать большим количеством данных, полученных различными независимыми способами оценки. Это гарантирует высокую достоверность и доказательность получаемых результатов.

MULTI-FUNCTIONAL MEASUREMENT SYSTEMS APPLICATION IN PRECLINICAL DRUG RESEARCH

G.A.Piavchenko, MD[1,2], Dr.L.Bachdasarian[3]; R.Bulthuis[3]; Dr. Prof. V.I.Nozdrin, MD[1,2]

[1] *J.-s.c. Retinoids, Preclinical Research Center, Russia, Moscow, Plekhanova str., 4*
[2] *Orel State University named after I.S. Turgenev, Medical Institute, Histology, Cytology and Embryology Department, Russia, Orel, Oktyabrskaya str., 25*
[3] *Metris B.V., The Netherlands, 2132 NG Hoofddorp, Kruisweg 829c*

Modern trends in pharmaceutical science development require a sufficiently high level of preclinical research quality. To achieve this goal in laboratory animals experiments it is necessary to implement a complex evaluation of the drug effect. In particular, it is important to assess the morphological and physiological organism condition, and the animals themselves should be contained in a controlled environment. Russian pharmaceutical science embarked on the principles of good laboratory practice following. Morphological estimation of the drug effect is to examine the changes in the organs and tissues structure. Such methods of drug effect evaluation reflect only structural changes, and do not allow to see the functional response of drug use in vivo. To assess the physiological effect of substance on animals it is considered to take into account the functional response of the organism. One of the most accessible for this purpose is an “open field” test. However, its use is associated with the presence of a number of drawbacks, such as subjective data and low reliability. These deficiencies are deprived in hardware and software systems that can automatically collect the studied parameters (behavioral reactions, physiological parameters and ultrasonic vocalizations of laboratory animals), and carry out its analysis, storage and protection. In research laboratories practice Laboras (behavioral reactions evaluation – motor activity, eating and drinking, sleeping, grooming, immobility, rearing, etc.), Sonotrack (ultrasonic vocalizations evaluation – the number of cries, duration, frequency, etc.) and DSI systems (telemetric physiological parameters evaluation) are used. In the case of all the parameters simultaneous recording in multiple devices connected to a single computer, it is possible to assess the same act that was registered by these systems, which allows the functional assessment of the drug influence and to operate a large number of data from various independent evaluation methods. This ensures high reliability and conclusiveness of the results.

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 57.083.01

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММА *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ТИП B

Салимова Е.Л., Конон А.Д., Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия
198320, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д.52
e-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Проводили идентификацию изолированного от больного ребенка штамма микроорганизма. Показано, что выделенный штамм принадлежит к *Haemophilus influenzae* тип b (Hib), который используется при производстве конъюгированной полисахаридной вакцины против Hib-инфекции.

Ключевые слова: идентификация, *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная полисахаридная вакцина.

На сегодняшний день в РФ вопросы диагностики и профилактики инвазивных форм инфекций, вызванных *Haemophilus influenzae* тип b (Hib), остаются во многом нерешенными, поэтому разработка отечественной вакцины против Hib является актуальной задачей. Целью настоящей работы явилось выделение чистой культуры *H. influenzae* тип b, идентификация и регистрация штамма – потенциального продуцента капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата (ПРФ), который является основным действующим веществом в полисахаридных вакцинах. Штамм выделяли путем смыва свабом со слизистой из носоглотки больного ребенка с дальнейшим высевом на селективную питательную среду (шоколадный агар) и проведением ряда пассажей. Показано, что выделенная культура была представлена грам отрицательными палочками овоидной формы, специфически взаимодействовала с моновалетной сывороткой тип b, проявляла потребность в факторах роста X (протопорфирин IX) и V (НАД), была оксидазо- и каталазоположительной. Полученные результаты позволили заключить, что изолят относится к виду *Haemophilus influenzae* и обладает серотипом b. Анализ 16S рРНК полностью подтвердил таксономическую принадлежность выделенного микроорганизма. Штамм был депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск» для целей национальной патентной процедуры под регистрационным номером В-7884.

UDC 57.083.01

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* SPB TYPE B STRAIN

Salimova E.L., Konon A.D., Truhin V.P., Petrovskii S.V., Krasilnikov I.V.

The federal state unitary enterprise "The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations" of Federal medical and biologic agency of Russia, Saint-Petersburg, Russia
198320, Saint-Petersburg, g. Krasnoe Selo, ul. Svobody, d. 52, Russia
e-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

The identification of the strain of microorganism, which had been isolated from a sick child, was carried out. It was shown that the isolated strain belongs to *Haemophilus influenzae* type b (Hib), which is used in the manufacture of a polysaccharide conjugate vaccine against Hib-infection.

Key words: identification, *Haemophilus influenzae* type b, conjugate polysaccharide vaccine

Nowadays the questions of diagnostics and preventive measures in terms of invasive infections caused by *Haemophilus influenzae* type b (Hib) are still largely unsolved in the Russian Federation, therefore the development of the local Hib vaccine is of immediate interest. This work was aimed at isolation of a pure culture of *H. influenzae* type b, identification and registration of the strain, which is a potential producer of the capsular polysaccharide polyribosylribitolphosphate (PRP). The last one is the main actual substance in polysaccharide vaccines. The strain was isolated by taking a swab from a mucosa of a sick child's pharyngonasal cavity with a further inoculation of selective medium (chocolate agar) and carrying out a series of passages. It was found that the selected culture was represented by Gram-negative coccobacilli. It specifically interacted with a monovalent serum type b and showed its need for growth factors such as X (protoporphyrin IX) and V (NAD). Furthermore, it was oxidase- and catalase-positive. These results let us conclude that the isolate refers to *Haemophilus influenzae* and possesses serotype b. The analysis of 16S rRNA fully confirmed the taxonomic affiliation of the isolated microorganism. The strain was deposited under the registration number B-7884 in the National collection of pathogenic microorganisms and cell cultures «GKMP-Obolensk» for the purposes of the national patent proceeding.

УДК 576.852+615.332

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ РЕГУЛИРУЕМОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ ПРОДУЦЕНТА ФЕРМЕНТА ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗЫ

Найденова А.С., Колодязная В.А.

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия,
Санкт-Петербург, Российская Федерация
197376, Санкт-Петербург, улица Профессора Попова, д. 14, литера А.
e-mail: anastasiya.naydenova@pharminnotech.com

Для диагностики содержания холестерина в крови человека используется микробная холестеролоксидаза (ХО). Процесс периодического культивирования продуцента фермента включает два этапа: выращивание посевного материала и биосинтез ХО. Предложена замена периодической ферментации на регулируемую, позволяющая подобрать оптимальные условия культивирования продуцента с увеличением выхода фермента.

Ключевые слова: фермент холестеролоксидаза, условия культивирования, регулируемая ферментация.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются существенной причиной смерти в мире [1]. Профилактика ССЗ крайне актуальна. Большинство факторов риска развития ССЗ управляемы, в частности, повышенное содержание липидов крови (холестерина и триглицеридов). Диагностические системы для определения холестерина основаны на использовании фермента холестеролоксидазы, получаемого только микробиологическим синтезом [2].

Кафедра биотехнологии СПХФА разрабатывает технологию биосинтеза холестеролоксидазы с применением штамма микроорганизма-продуцента *Streptomyces lavendulae* [1,3]. Совершенствование технологии позволит предложить данный штамм для промышленного получения фермента в России, позволяющий обеспечить производство диагностических тест-систем, используемых для определения содержания холестерина в крови человека экспресс-методом. Для обеспечения эффективной работы биотехнологического производства необходимо повысить продуктивность и выход целевого фермента, что достигается посредством применения более перспективных методов ферментации.

Рисунок 1. *Сравнение способов культивирования в лабораторных условиях*

Выращивая культуру *S. lavendulae*, использовали питательную среду (ПС) состава (%): *глюкоза* (1,0), NH_4NO_3(0,2), $CaCO_3$(0,2), *дрожжи хлебопекарные* (2,6), среда растворения – водопроводная вода, pH среды до стерилизации – 6,5. Опыты проводили при t°=28±1°C в колбах Эрленмейера на качалочной платформе (интенсивность колебаний 200-220 мин$^{-1}$). Результаты экспериментов оценивали по уровню накопления биомассы и активности полученного фермента, которую определяли методом Ричмонда [4]. Технология микробного синтеза основывается на периодической («классической») ферментации продуцента *S. lavendulae,* предполагающей ступенчатое наращивание (рис. 1). Было предложено применить вместо «классической» регулируемую ферментацию (рис. 1), которая является промежуточной между периодической и непрерывной [5]. В таком варианте возможно исключение как отдельной стадии выращивание посевного материала и перенос его на стадию ферментации. Опыты по использованию *регулируемой ферментации* заключались в проведении *доливной (полупериодическая) ферментации*, предполагающей долив ПС (обычной или с измененным количественным составом) до конечного рабочего объема качалочной колбы (рис.1, «a», «b»), и *отъемно-доливной (полунепрерывной) ферментации*, в ходе которой производился отлив части культуральной жидкости и долив ПС (рис.1, «c», «d»).

В доливной ферментации (рис.1, «a»; исходный объем ПС – 100 мл и объем долива ПС – 50 мл) активность эндофермента увеличилась по сравнению с контролем (периодической ферментацией) на 32,0±4,6%. Во варианте «b» изменили состав долива (увеличили количество источника органического азота), что привело к нежелательному повышению активности экзофермента. Это является отрицательным аспектом для последующей стадии выделения в данной технологии.

При проведении варианта «c» (рис. 1; исходный объем 150 мл, объем отлива-долива 75 мл) активность эндофермента возросла на 43% относительно контроля. Во варианте «d» (рис. 1; объемы аналогичны «c») была скорректирована концентрация дрожжей в доливе ПС, что позволило получить существенное увеличение активности эндофермента по сравнению с контролем – на 48±4,2%.

В настоящее время на кафедре биотехнологии СПХФА продолжаются работы по оптимизации отъемно-доливной (регулируемой) ферментации, результаты проведенных экспериментов апробируются при масштабировании условий культивирования продуцента холестеролоксидазы в лабораторном биореакторе BIOSTAT® Aplus (Sartorius).

Литература:

1. *Найденова, А.С. Регулируемая ферментация продуцента фермента холестеролоксидазы / А.С. Найденова, В.А. Колодязная // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 9-10 ноября 2016 г. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2016. - с. 144 – 148.*
2. *Kumari, L. Cholesterol Oxidase and Its Applications / L. Kumari, S. Kanwar // Advances in Microbiology. – 2012; Vol. 2, № 2. - p. 49 – 65.*
3. *Умнова, О.А. Получение активного посевного материала Streptomyces lavendulae с использованием лабораторного шейкер CERTOMAT / О.А. Умнова, Т.В. Булдакова, В.А. Колодязная, Е.П. Яковлева // Мат-лы VIII Моск. Междунар. Конгресса «Биотехн.: сост. и персп. развития», 17-20 марта 2015г., Москва. - М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Менделеева, 2015. - с. 84 - 86.*
4. *Richmond, W. Preparation and Properties of a Cholesterol Oxidase from Nocardia sp. and its Application to the*

Enzymatic Assay of Total Cholesterol in Serum / Richmond W. // Clinical Chemistry. – 1973; Vol. 19, №12. - p. 1350 - 1356.
5. *Сазыкин, Ю.О. Биотехнология: уч. пос. для студ. высш. уч. зав. / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - 3-е изд., стер. - М.: Изд. центр «Академия», 2008. – 256 с.*

УДК 576.852+615.332

OPTIMIZATION CONDITIONS OF FED-BATCH CULTIVATION PROCESS OF THE PRODUCER OF THE ENZYME CHOLESTEROL OXIDASE

Naydenova A.S., Kolodyaznaya V.A.

Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Russian Federation
14A, Prof. Popov St., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation
e-mail: anastasiya.naydenova@pharminnotech.com

Microbial cholesterol oxidase is used for diagnosis of cholesterol concentration in human blood. Batch cultivation process of the producer of the cholesterol oxidase includes two stages: produce an inoculum and process of enzyme biosynthesis. The change batch processing for fed-batch is offered that allows to select optimum conditions of fermentation for increase the yield of the enzyme.

Key words: enzyme cholesterol oxidase, conditions of cultivation, fed-batch cultivation process.

Cardiovascular diseases are an essential cause of death in the world [1]. The most of risk factors of development of cardiovascular diseases are managed; in particular, the increased level of blood lipids (cholesterol and triglycerides). Diagnostic systems for cholesterol definition are based on use of the enzyme cholesterol oxidase received only by microbiological synthesis [2].

The department of biotechnology of SPCPA develops technology of the cholesterol oxidase biosynthesis with application of the microorganism producer strain *Streptomyces lavendulae* [1,3]. Perfecting of the technology will allow offering this strain for industrial obtaining enzyme in Russia to provide manufacture of the diagnostic test systems used for level definition of cholesterol in human blood by express method. For ensuring effective work of the biotechnological production it is necessary to increase productivity and enzyme yield that is reached by use of more perspective methods of fermentation.

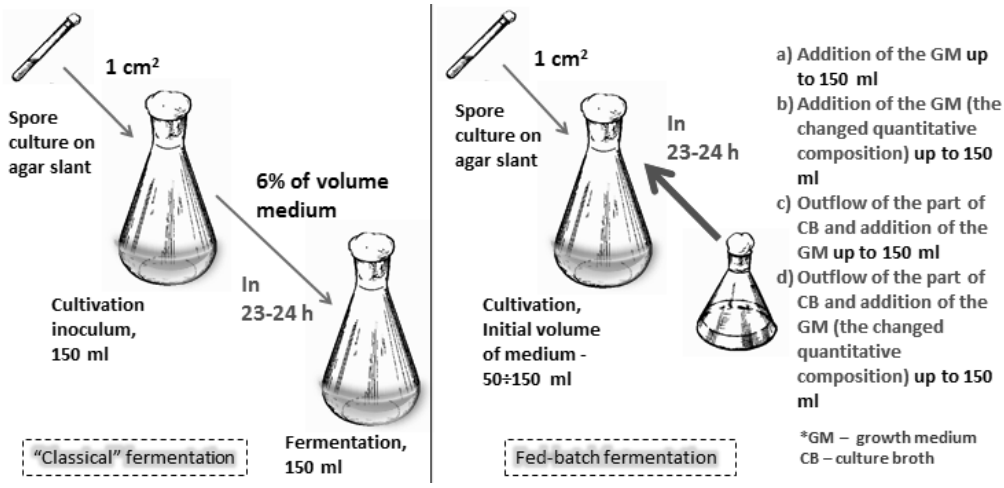


Figure 1. *Comparison of the fermentation methods in laboratory conditions.*

At cultivation of *S. lavendulae* used the growth medium (GM) of composition (%): *glucose* (1.0), NH_4NO_3 (0.2), $CaCO_3$ (0.2), *baker's yeast* (2.6), the dissolution medium – tap water, medium pH before sterilization – 6.5. Experiments were made at a temperature of 28±1°C in Erlenmeyer's flasks on the shaker-platform (oscillation strength 200-220 rpm). Results of experiments evaluated on accumulation of the biomass and by the activity level of the received enzyme which was determined by method of Richmond [4]. The technology of microbiological synthesis is based on periodic ("classical") fermentation of *S. lavendulae* assuming step cultivation (fig. 1). It was offered to

use in place of "classical" fed-batch fermentation (fig. 1) which is intermediate between periodic and continuous fermentation [5]. Thus there is the exception the cultivation of inoculum as separate stage and its transfer on a fermentation stage. Experiments on use of fed-batch fermentation consisted in carrying out *added (semi-periodic) fermentation*, assuming addition of the GM (usual or with the changed quantitative composition) up to the final working volume of Erlenmeyer's flask (fig.1, "a", "b"), and *sequencing batch (semi-continuous) fermentation,* assuming the outflow of the part of culture broth (CB) and addition of the GM (fig.1, "c", "d").

In option "a" (fig. 1; the initial volume of medium is 100 ml and volume of addition of the GM is 50 ml) activity of the endoenzyme has increased versus control (periodic fermentation) by 32.0±4.6%. In option "b" (fig. 1) have changed composition of addition (have increased concentration of a source of organic nitrogen) that has shown undesirable increase in activity of the exoenzyme. It is negative aspect for the subsequent stage of enzyme separation in this technology.

In option "c" (fig. 1; the initial volume of the GM is 150 ml and volume of outflow CB and addition the GM is 75 ml) activity of the endoenzyme has increased versus control by 43%. In option "d" (fig. 1; volumes as in "c") concentration of baker's yeast in addition of the GM has been corrected; that has allowed receiving essential increase in activity of the endoenzyme versus control by 48.0±4.2%.

Now at the department of biotechnology of SPCPA works on fed-batch fermentation optimization are continued, results of the made experiments are approved in scaling cultivation conditions of the producer of the cholesterol oxidase in the laboratory bioreactor BIOSTAT® Aplus (Sartorius).

References:

1. *Naydenova, A.S. Reguliruemaya fermentaciya producenta fermenta holesteroloksidazy / A.S. Naydenova, V.A. Kolodyaznaya // Sbornik materialov IV Vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdorov'e nacii», St. Petersburg, 9-10 noyabrya 2016 g. – SPb.: Izd-vo SPHFA, 2016. - p. 144 – 148.*
2. *Kumari, L. Cholesterol Oxidase and Its Applications / L. Kumari, S. Kanwar // Advances in Microbiology. – 2012; Vol. 2, № 2. - p. 49 – 65.*
3. *Umnova, O.A. Poluchenie aktivnogo posevnogo materiala Streptomyces lavendulae s ispol'zovaniem laboratornogo shejker CERTOMAT / O.A. Umnova, T.V. Buldakova, V.A. Kolodyaznaya, E.P. Yakovleva // Mat-ly VIII Mosk. Mezhdunar. Kongressa «Biotekhn.: sost. i persp. razvitiya», 17-20 marta 2015 g., Moskva. - M.: ZAO «EHkspo-biohimtekhnologii», RHTU im. Mendeleeva, 2015. - p. 84-86.*
4. *Richmond, W. Preparation and Properties of a Cholesterol Oxidase from Nocardia sp. and its Application to the Enzymatic Assay of Total Cholesterol in Serum / Richmond W. // Clinical Chemistry. – 1973; Vol. 19, №12. - p. 1350 - 1356.*
5. *Sazykin, Yu.O. Biotekhnologiya: uch. pos. dlya stud. vyssh. uch. zav. / Yu.O. Sazykin, S.N. Orekhov, I.I. Chakaleva; pod red. A.V. Katlinskogo. - 3-e izd., ster. - M.: Izd. centr «Akademiya», 2008. – 256 p.*

УДК 576.32/.36+544.6.076.326

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВАЦИИ МАКРОФАГОВ В МОДЕЛЯХ *IN ELECTRODE*: МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

Черенков И.А., Никитина Е.С., Сергеев В.Г.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, д.1. корпус 1
e-mail: ivch75@yandex.ru

Исследованы способы сопряжения активации макрофагов с электрохимическими процессами. Показаны возможности биоэлектрохимического моделирования для изучения животных клеток.

Ключевые слова: макрофаги, биоэлектрокатализ, медиаторы электрохимического переноса, электроактивные полимеры.

Исследования биоэлектрохимических систем с участием живых клеток направлены на создание клеточных биосенсоров или биотопливных элементов [1]. Актуальным представляется решение обратной задачи – исследовать состояние клетки в электрохимической системе. Подобный подход показал свою эффективность в молекулярной биоэлектрохимии [2, 3]. Условия электрохимического эксперимента позволяют сформировать контролируемое микроокружение для исследования факторов межмоле-

кулярных взаимодействий. Такой метод биологического моделирования обозначен как «*in electrode*» [3]. Конструирование биоэлектрохимических систем с разными способами сопряжения биокаталитических и электрохимических процессов может быть использовано для изучения метаболизма и дифференцировки клеток.

Целью настоящей работы стало исследование активации макрофагов, иммобилизованных на планарном графитовом электроде в условиях различных способов сопряжения биохимических и электрокаталитических реакций.

Макрофаги на поверхности планарного графитового электрода эффективно восстанавливали толуидиновый синий (ТС). При стимуляции клеток бактериальным липополисахаридом интенсивность окислительно-восстановительных превращений красителя возрастала. Это можно связать с активацией внутриклеточных процессов, способствующих накоплению восстановленной формы ТС ($НАДФН_2$, НАДНХ, $ФАДН_2$ способны выступать в качестве восстановителей для ТС). Аналитическим сигналом этого процесса является рост значений токов электроокисления ТС.

Компоненты, выделяемые макрофагом в ходе активации, могут непосредственно окислять ТС, конкурируя с процессом электроокислением. Для оценки внеклеточных окислительно-восстановительных реакций было исследовано сопряжение активации макрофага с электрохимическими процессами посредством полимерной формы ТС, полученной непосредственно на графитовом электроде по известным методикам [4].

Реакцией полимера на стимуляцию клеток стал рост пиковых токов. Значения токов оказались ниже показателей, полученных для растворимой формы медиатора – однако, учитывая поверхностные концентрации медиаторов (для полимера ≈ $1{,}4\cdot10^{-9}$ моль/см^2; для мономерной формы ≈ $5{,}3\cdot10^{-9}$ моль/см^2) на электроде можно сделать вывод о существенном вкладе внеклеточных окислительно-восстановительных процессов в формирование отклика.

Исследованные модели окажутся полезными для описания состояния макрофагов как звена иммунитета, оценки влияния различных химических агентов на активацию клеток, а также для изучения роли окислительно-восстановительного окружения в процессах формирования цитофенотипов макрофагов.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-00246-а и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в Удмуртской республике (программа «УМНИК»).

Литература:
1. *Güven G., Lozano-Sanchez P., Güven A. Power Generation from Human Leukocytes/Lymphocytes in Mammalian Biofuel Cell // Int. J. Electrochem. 2013. Vol. 2013. P. 1-11.*
2. *Lopes P., Dyrnesli H., Lorenzen N., Otzen D., Ferapontova E.E. Electrochemical analysis of the fibrillation of Parkinson's disease α-synuclein // Analyst. 2014. Vol. 139. № 4. P. 749-756.*
3. *Шумянцева В.В., Булко Т.В., Супрун Е.В., Кузиков А. В., Агафонова Л.Е., Арчаков А.И. Электрохимические методы в биомедицинских исследованиях // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 2. – С. 188-202.*
4. *Karyakin A.A., Karyakina E.E., Schmidt H.-L. Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers // Electroanalysis. 1999. Vol. 11. № 3. P. 93-110.*

.....

UDC 576.32/.36+544.6.076.326

METHODOLOGICAL APPROACHES TO STUDY OF MACROPHAGE ACTIVATION IN ELECTRODE MODELS

Cherenkov I.A., Nikitina E.S., Sergeev V.G.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Udmurt State University", Izhevsk, Russia
426034 Izhevsk, Universitetskaya str., 1. Campus bld. 1
e-mail: ivch75@yandex.ru

The ways of conjugating macrophage activation with electrochemical processes have been studied. The possibilities of bio-electrochemical modeling for the study of animal cells have been shown.

Key words: macrophages, bioelectrocatalysis, mediators of electrochemical transfer, electroactive polymers.

The study of bio-electrochemical systems involving living cells are aimed at creating cell biosensors and biofuel cells [1]. Inverse modeling that implies the study of a cell state in an electrochemical system remains pertinent. This approach has proved to be effective in molecular bioelectrochemistry [2, 3]. The terms of

electrochemical experiments make it possible to generate a controlled microenvironment for studying factors of intermolecular interactions. Such approach to biological modeling is referred to as "*in electrode*" [3]. Construction of bioelectrochemical systems with different ways of conjugating biocatalytic and electrochemical processes can be used to study metabolism and cell differentiation.

This work aims to study activation of macrophages which are immobilized on a planar graphite electrode under the conditions of various ways of conjugating biochemical and electrocatalytic reactions.

The macrophages effectively recovered the toluidine blue (TB) on the planar graphite electrode surface. Bacterial LPS stimulation of cells increased the intensity of redox transformation of the stain. This can be associated with activation of intracellular processes that contributes to the accumulation of the reduced TB (NADPH, NADH, $FADH_2$ can be used as reductive agents for TB). The analytical response of this process is the growth of current values in TB electrochemical oxidation.

Components allocated during macrophage activation can directly oxidize TB competing at the same time with the electrooxidation process. To assess the extracellular oxidation-reduction reactions we studied macrophage activation conjugacy with electrochemical processes using TB polymeric form obtained directly on the graphite electrode according to the known methods [4].

The polymer reacted to cell stimulation by the growth of the peak-point currents. The currents values turned to be lower than those obtained for a soluble mediator. However, taking into account the mediator surface concentrations on the electrode (for polymers ≈ $1.4 \cdot 10^{-9}$ mol/cm^2; for monomeric forms ≈ $5.3 \cdot 10^{-9}$ mol/cm^2) it may be concluded that extracellular oxidation-reduction reactions have significantly contributed to the response formation.

The studied models will be useful for describing a macrophage state as a component of the immune system, for assessing the influence of various chemical agents on cells activation, as well as for studying the role of the redox environment for macrophage cytophenotypes formation.

This research has been supported by RFBR grant 10-04-00246-a and the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology in the Udmurt Republic ("UMNIK" program).

References:

1. *Güven G., Lozano-Sanchez P., Güven A. Power Generation from Human Leukocytes/Lymphocytes in Mammalian Biofuel Cell // Int. J. Electrochem. 2013. Vol. 2013. P. 1-11.*
2. *Lopes P., Dyrnesli H., Lorenzen N., Otzen D., Ferapontova E.E. Electrochemical analysis of the fibrillation of Parkinson's disease α-synuclein // Analyst. 2014. Vol. 139. No. 4. P. 749-756.*
3. *Shumyantseva V. V., Bulko T. V. Suprun E. V. Kuzikov A. V. Agafonova L. E. Archakov A. I. Electrochemical methods in biomedical studies // Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2015. Vol. 9, No 3. P. 228–243.*
4. *Karjakin A.A., Karyakina E.E., Schmidt H.-L. Electro Polymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers // Electroanalysis. 1999. Vol. 11. No. 3. P. 93-110.*

ДИНАМИКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРАСНОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ВОСПОЛНЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРИ У СОБАК ОПЫТНЫМ КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕМ, СОДЕРЖАЩИМ ЭРИТРОЦИТЫ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Шперлинг И.А.[1], Галака А.А.[2], Соловьев И.А.[2], Сафаров Р.Р.[3], Лошманов М.М.[3], Крупин А.В.[1], Романов П.А.[1]

[1] ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, г. Санкт-Петербург;
[2] ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», г. Санкт-Петербург.
[3] ООО «Клеточные системы», г. Москва.

Кровотечение – часто встречающееся последствие ранений, травм. Острая массивная кровопотеря без оказания помощи угрожает жизни пострадавшего или раненного. После выполнения манипуляций по остановке кровотечения (наложение жгута, применение местных гемостатических средств, перевязка сосудов и др.) важнейшим мероприятием оказания помощи является восполнение кровопотери [Самохвалов И.М. и соавт., 2009]. В зависимости от объема кровопотери применяются препараты крови (эритроцитарная масса, плазма и ее препараты) и кровезаменители (плазмозаменители гемодинамического, противошокового, реологического действия). Эффективность препаратов крови при правильном их использовании наиболее высока.

Современные биомедицинские технологии позволяют разрабатывать кровезаменители различного состава. При этом на разных стадиях разработки препаратов безопасность и эффективность кровезаменителей должна быть доказана на экспериментальных животных. Согласно Методическим рекомендациям по доклиническому изучению противошоковых (гемодинамических) кровезаменителей направленного и полифункционального действия [Миронов А.Н. и соавт., 2012] эксперименты проводятся на модели острой кровопотери у собак путем предварительной эксфузии крови. Вместе с тем, модели для оценки опытных кровезаменителей, содержащих клеточные переносчики кислорода, отсутствуют, что диктует необходимость адаптации существующих методик к реальным условиям.

Целью исследования явилось обоснование возможности оценки эффективности опытного кровезаменителя, содержащего эритроциты пуповинной крови человека (ОК) на стандартной модели кровопотери. Учитывая известную иммуногенную несовместимость крови собаки и человека, в рамках адаптации методологии оценки эффективности опытного кровезаменителя было использовано сравнение показателей количественного состава красной крови (количество эритроцитов, гематокрит) после восполнения острой кровопотери у собак опытным кровезаменителем и эритроцитарной массой человека ЭрМЧ, заготавливаемой в соответствии с требованиями стандартов и используемой в клинической практике. Для оценки степени разрушения эритроцитов использовали индекс деструкции эритроцитов [Шперлинг И.А. и соавт., 2006]. Образцы ОК представлены ООО «Клеточные системы» (Москва).

В результате исследования установлено, что внутривенное вливание ОК сразу после трансфузии практически восстанавливало количественные показатели красной крови и через 1 сут не отличалось от исходных показателей. Внутривенное вливание ЭрМЧ сразу после трансфузии практически восстанавливало количественные показатели красной крови, но к исходу 1-х сут эксперимента их значения были достоверно ниже нормы (практически в 2 раза).

Изменения количественных показателей красной крови после вливания ОК и ЭрМЧ связаны с разрушением эритроцитов в сосудистом русле в результате переливания ксеногенной эритроцитарной массы, на что указывали высокие значения индекса деструкции эритроцитов сразу после вливания препаратов (индекс был более выражен у собак после вливания ЭрМЧ). Более продолжительное по времени разрушение эритроцитов (по показателю индекса деструкции) привело к развитию выраженной анемии после вливания ЭрМЧ через 1 сут от начала вливания. У собак после вливания ОК в аналогичный период исследования анемии не было. Выявленные различия в «гемолитическом потенциале» примененных кровезаменителей объясняется более молодой популяцией эритроцитов пуповинной крови по сравнению с эритроцитами периферической крови доноров.

Таким образом, сравнительный анализ количественных показателей красной крови у собак после восполнения острой кровопотери опытным кровезаменителем и эритроцитарной массой человека с помощью традиционной методики оценки эффективности кровезаменителей позволил установить положительный кровезамещающий эффект эритроцитов пуповинной крови.

QUANTITATIVE CHARACTERISTICS DYNAMICS OF RED BLOOD AFTER DOGS EXPERIMENTAL ACUTE BLOOD LOSS REPLENISHMENT USING EXPERIMENTAL BLOOD SUBSTITUTE CONTAINING ERYTHROCYTES FROM HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD

Shperling I.A.[1], Galaka A.A.[2], Solov'ev I.A.[2], Safarov R.R.[3], Loshmanov M.M.[3], Krupin A.V.[1], Romanov P.A.[1]

[1] Federal state budgetary establishment «State scientific research test institute of the military medicine» of the Ministry of defense of the Russian Federation, Saint-Petersburg;
[2] Federal state budgetary military educational institution of higher education «Military Medical Academy named after S.M. Kirov» of the Ministry of defence of the Russian Federation, Saint-Petersburg;
[3] LLC «Cell Systems», Moscow.

Bleeding is the most common consequence of wounding, injury. Sharp massive blood loss without giving an aid could be danger to patient life or wounded man life. After arrest of bleeding interventions (place tourniquet, application of topical hemostatic products, provisional ligature etc.) the most important action of aiding is blood loss replenishment [Samohvalov I.M. and Co, 2009]. Depending of the blood volume are used blood products (packed red blood cells, plasma and its preparations) and blood substitutes (plasma extenders sanguimotory, antishock and rheological action). Blood preparations effectiveness has the highest results if only it used correctly.

Modern biomedical technologies allow to develop blood substitutes of various composition. At the same time in various stages of drugs development blood substitutes safety and effectiveness must be proved on experimental animals. According to methodical recommendations on pre-clinical study of antishock (hemodynamic) directed and multifunctional action blood substitutes [Mironov A.N. and Co, 2012] the experiments are carried out on the model of dogs acute blood loss by preliminary blood exfusion. At the same time test blood substitutes, containing cellular oxygen carriers) evaluation models are absent. It requires the adaptation of existing methods to the real-life environment.

The goal of this study is the proof of possibility to evaluate test blood substitute, containing human umbilical cord blood packed red cells effectiveness using the blood loss standard model. Considering immunogenic incompatibility of dog blood and human blood, it was used the comparison of red blood cells (erythrocyte amount, hematocrit) quantitative composition characteristics after acute blood loss replenishment of dogs using test blood substitute and human packed red blood cells produced according to the standards and used in clinical practice. To evaluate the degree of erythrocyte destruction the erythrocyte destruction index was used [Shperling I.A. and Co, 2006]. Human umbilical cord blood packed red cells samples are presented by LLC "Cell Systems" (Moscow).

The study found that human umbilical cord blood packed red cells infusion immediately after the transfusion is almost restored the quantity of red blood and in 1 day did not differ from initial characteristics values. Intravenous human packed red blood cells immediately after transfusion almost restored the quantitative characteristics of red blood, but by the end of the 1st day experimental values were significantly lower than normal (almost 2 times).

The quantitative red blood characteristics changes after human umbilical cord blood packed red cells and human packed red blood cells infusion associated with erythrocyte destruction in bloodstream due to heterogenic packed red blood cells transfusion. The high values of erythrocyte destruction index pointed to it (the index was more pronounced in dogs after infusion of human packed red blood cells). Longer erythrocyte destruction time led to the marked anemia development after infusion human packed red blood cells after 1 day from the start of infusion. The dogs didn't have anemia after human umbilical cord blood packed red cells infusion during the same period of study. More younger umbilical cord blood erythrocytes population compared to the peripheral blood donors erythrocytes explains the differences in the "hemolytic potential" of applied blood substitutes.

Thus, comparative analysis of dogs red blood quantitative characteristics after replenishment acute blood loss using test blood substitute and human packed red blood cells using general effectiveness evaluation method allowed to establish positive blood-substituting effect of umbilical cord blood erythrocytes.

К ВОПРОСУ О МЕТОДОЛОГИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ С КЛЕТОЧНЫМ КОМПОНЕНТОМ

Шперлинг И.А.[1], Галака А.А.[2], Юркевич Ю.В.[1], Соловьев И.А.[2], Крупин А.В.[1], Гребенюк А.Н.[3], Лошманов М.М.[4]

[1] ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, г. Санкт-Петербург;
[2] ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург;
[3] ООО «Научно-Проектная Компания «СпецПроект», г. Санкт-Петербург;
[4] ООО «Клеточные системы», г. Москва.

Проблема восполнения объема потерянной крови и ее коллоидно-осмотического давления решается использованием кристаллоидных и коллоидных растворов. Для поддержания агрегатного состояния крови и ее кислородно-транспортной функции при большой кровопотере невозможно обойтись без плазмы и эритроцитов человека. Трансфузия компонентов донорской крови представляет собой сложную медицинскую, социальную и экономическую проблему [Жибурт Е.Б. и соавт., 2014]. Регенеративная медицина является одним из приоритетных направлений современной медицины, в рамках которого рассматриваются вопросы создания биомедицинских препаратов на основе продуктов культивирования клеток. Создание препаратов на основе продуктов клеточных технологий требует разработки экспериментальных моделей и методик для оценки их эффективности и безопасности.

Подходы к оценке эффективности лекарственных средств, полученных на основе биотехнологий, могут базироваться на общих принципах комплексного изучения потенциальных лекарственных средств (А.Н. Миронов, 2012). Вместе с тем, установлено, что при экспертизе клеточных продуктов эти традиционные подходы не в полной мере приемлемы в связи с уникальностью и разнообразием структурных и биологических свойств клеточного компонента.

Методический подход, заложенный в экспериментальную модель и анализ результатов для оценки эффективности образцов кровезаменителей с клеточным компонентом сводится к следующему: при планировании экспертизы кровезаменителей с клеточным компонентом следует иметь четкое представление о биологических свойствах, особенностях строения и функции клеток, возможных реакциях биосовместимости. На начальном этапе необходимо оценивать неспецифические (неиммуногенные) эффекты препарата (гемодинамические, газотранспортные и т.д.). В дальнейшем эффекты образцов следует оценивать в рамках биосовместимости на альтернативных моделях, в том числе культивируемых линиях донорских клеток человека. Совокупность положительных результатов оценки эффективности и безопасности биомедицинского клеточного продукта, полученных на разных экспериментальных моделях, позволит повысить степень объективности экстраполяции результатов доклинических исследований на эффекты, проявляющиеся в рамках клинических исследований. Такой подход создаст основу для совершенствования программ и методик, используемых в рамках доклинических исследований кровезаменителей с клеточным компонентом и других продуктов биомедицинских технологий.

С целью обоснования методических подходов к проведению доклинических исследований кровезаменителей с клеточным компонентом проведено исследование на собаках.

Животным после эксфузии крови в объеме 4,2-4,8% от веса тела внутривенно вводили опытный образец кровезаменителя, состоящий из эритроцитарной массы пуповинной крови человека и сукцинированного желатина. Препаратом сравнения служила эритроцитарная масса периферической крови человека, разрешенная для применения в клинической практике.

В исследовании были получены данные о высокой эффективности опытного образца кровезаменителя с эритроцитами пуповинной крови и эритроцитарной массы крови человека у собак в ранний период после возмещения кровопотери (в течение 1-х сут эксперимента) в рамках газотранспортной, волемической, циркуляторной функций крови. Результаты исследования подтверждают предположение о возможности сравнения эффектов опытного образца кровезаменителя с клеточным компонентом в виде эритроцитов пуповинной крови человека и зарегистрированного кровезаменителя из компонентов крови (эритроцитарная масса периферической крови человека) на экспериментальной модели острой кровопотери с использованием животных.

.....

THE PROBLEM OF PRE-CLINICAL STUDIES METHODOLOGY OF BLOOD SUBSTITUTES WITH CELLULAR COMPONENT

Shperling I.A.[1], Galaka A.A.[2], Jurkevich Ju.V.[1], Solov'ev I.A.[2], Krupin A.V.[1], Grebenjuk A.N.[3], Loshmanov M.M. [4]

[1] Federal state budgetary establishment «State scientific research test institute of the military medicine» of the Ministry of defense of the Russian Federation, Saint-Petersburg;
[2] Federal state budgetary military educational institution of higher education «Military Medical Academy named after S.M. Kirov» of the Ministry of defense of the Russian Federation, Saint-Petersburg;
[3] LLC «scientific design company «Spetsproekt», Saint-Petersburg;
[4] LLC «Cell Systems», Moscow.

The problem of blood lost replenishment and its colloid osmotic pressure is solved by using of crystalloid and colloid solutions. It is necessary to use human plasma and erythrocytes to maintain blood aggregate state and its oxygen-transport function at a large blood loss. Donor blood components transfusion is a complex medical, social and economic problem[Zhiburt E.B. and Co, 2014]. Regenerative medicine is one of modern medicine priorities, which examines the creation of biomedical drugs based on the cell cultivation products. The creation of drugs based on the cultivation products requires the development of experimental models and methods to evaluate its effectiveness and safety.

Approaches to evaluate the effectiveness of drugs derived from biotechnology can be based on the general principles of a comprehensive study of potential drugs (A.N. Mironov, 2012). It is found that for the cell products examination, these approaches are not fully acceptable because of the uniqueness and variety of cell components structural and biological properties.

The approach of the experimental model and analysis of results to evaluate the blood substitutes with cellular component effectiveness is as follows: to examine the blood substitutes with cellular components it is necessary to know biological properties, cells function and its structure features, possible biocompatibility reactions. At the initial stage it os necessary to evaluate non-specific (non-immunogenic) effects of the drug (hemodynamic, gas transmission, etc.) In the future, the effects of the samples should be evaluated the biocompatibility of alternative

models, including the donor cultured human cells lines. The positive results set of effectiveness and safety evaluation of biomedical cellular product, obtained from different experimental models, allows to improve the pre-clinical studies results extrapolation degree of objectivity for effects, appearing during the clinical studies. This approach will create the basis to improving of programs and methods which are used in pre-clinical studies of blood substitutes with cellular component and other biomedical technologies products.

To establish the methodological approaches to conduct pre-clinical studies of blood substitutes with cellular component the study on dogs was conducted.

After the blood exfusion in the amount of 4.2-4.8% of body weight the prototype blood substitute consisting of human umbilical cord blood packed red cells and modified gelatin. As a comparator product human peripheral blood packed red cells was used. It is allowed to use it in clinical practice.

In the study the results of blood substitute human umbilical cord blood erythrocytes and packed red cells prototype high effectiveness for gas-transport, volemic and circulatory blood functions at the early period after blood loss replenishment (1 day after experiment) for dogs were obtained. The study results confirm the expectation about possibility of comparison blood substitute with cellular component as human umbilical cord blood erythrocytes test sample and registered blood substitute consisted of blood components (human peripheral blood packed red cells) in experimental model of acute blood loss using animals.

УДК 621.119

ОЦЕНКА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК С ЦЕЛЬЮ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИНФОРМАТИВНЫХ КЛЕТОК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ, ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ДЕСТРУКЦИИ МИКРОСОСУДИСТОГО РУСЛА ПРИ ПАТОЛОГИИ ЛЕГКИХ, ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СЕМЕННИКОВ

Скурихин Е.Г., Першина О.В., Пахомова А.В., Крупин В.А., Пан Э.С., Кудряшова А.И., Рыбалкина О.Ю., Ермолаева Л.А., Дыгай А.М.

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия, Томск, ул. Ленина, 3
e-mail: vakrupin88@gmail.com

Выявлены эндотелиальные прогениторные клетки и клетки-предшественники ангиогенеза – потенциальные клетки-маркеры микрососудистых травм при патологии.

Ключевые слова: эндотелиальные прогениторные клетки, клетки-предшественники ангиогенеза, эмфизема легких, пневмофиброз, гипогонадизм, диабет, рак молочной железы

В процессе образования новых сосудов задействованы различные по иммунофенотипу и свойствам эндотелиальные прогениторные клетки, клетки-предшественники ангиогенеза, эндотелиальные клетки, мезенхимальные предшественники и др. популяции клеток. Единого мнения о роли каждого клона эндотелиальных предшественников в ангиогенезе при той или иной патологии нет. Это затрудняет диагностику травм микрососудистого русла, прогнозирование течения и терапию основного заболевания.

Целью исследования явилась цитометрическая и иммуногистохимическая оценка эндотелиальных прогениторных клеток, клеток-предшественников ангиогенеза, эндотелиальных клето к в тканях при патологии.

Материал и методы. Моделировали пневмофиброз, эмфизему легких, рак молочной железы, диабет 1 и 2 типа, гипогонадизм и с использованием методов проточной цитометрии и ИГХ в тканях линейных мышах изучали различные клоны эндотелиальных прогениторных клеток, клеток-предшественников ангиогенеза, эндотелиальных клеток.

Результаты. Выявлены потенциальные маркеры-стволовые / прогениторные клетки для диагностики травм микрососудистого русла, прогнозирование течения и осложнений заболеваний легких, поджелудочной железы, молочной железы и семенников.

UDC 621.119

EVALUATION OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS TO INDENTIFY POTENTIAL CELL MARKERS FOR DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF THERAPY EFFECTINESS OF MICROVASCULAR DESTRUCTION IN PATHOLOGY LUNGS, PANCREAS, BREAST AND TESTIS

Skurikhin EG, Pershina OV, Pakhomova AV, Krupin VA, Pan ES, Kudryashova AI, Rybalkina OY, Ermolaeva LA and Dygai AM

Federal State Scientific Institution "Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine" Tomsk NRMC, Tomsk, Russia
643028, Tomsk, Lenin street, 3
e-mail: vakrupin88@gmail.com

We detected endothelial progenitor cells and progenitor cells of angiogenesis - potential cell markers of microvascular injury in pathology.

Keywords: endothelial progenitor cells, precursors of angiogenesis, pulmonary emphysema, pulmonary fibrosis, hypogonadism, diabetes, breast cancer

Various populations of endothelial progenitor cells, endothelial cells, precursor cells of angiogenesis, mesenchymal precursors etc. participate in formation of new blood vessels. There is no consensus about the role of each clone of endothelial progenitors in angiogenesis in various diseases. It is difficult to diagnose microvascular injury, to predict a disease development and to treat a disease.

The aim of our study was cytometric and immunohistochemical evaluation of endothelial progenitor cells, endothelial cells and precursor cells of angiogenesis in diseases.

We modelled pulmonary emphysema, pulmonary fibrosis, hypogonadism, breast cancer, type 2 diabetes and type 1 diabetes to investigate different clones of endothelial progenitor cells, endothelial cells and precursor cells of angiogenesis in tissues of mice, using cytometric and immunohistochemical methods.

We identified potential cells markers (stem / progenitor cells) for the detection of microvascular injury, prognosis of the course and complications of the diseases (lungs, pancreas, breast and testes).

БИОФАРМАЦЕВТИКА
BIOPHARMACEUTICS

СЕКЦИЯ
ПРОМЫШЛЕННАЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

SECTION
INDUSTRIAL AND PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 579.61.615.33

АНТИМИКОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ ПОРЯДКОВ EUROTIALES И HYPOCREALES И ОТБОР ШТАММА – ПРОДУЦЕНТА ПЕПТАИБОЛОВ

Баранова А.А., Куварина А.Е., Коршун В.А., Кураков А.В., Садыкова В.С.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия
119021, Москва, ул. Б. Пироговская, д.11, стр.1
e-mail: anjabaranowa@list.ru

Проведен анализ распространенности способности к образованию антигрибных соединений у 914 штаммов порядков Eurotiales и Hypocreales. Отобран штамм T. citrinoviride ВКПМ F-1228 и отработана процедура оптимизации условий синтеза, выделения и очистки антибиотического комплекса пептаиболов.

Ключевые слова: антимикотическая активность, микромицеты, пептаиболы.

Микроскопические грибы порядков Eurotiales и Hypocreales, представляют особый интерес для поиска продуцентов антимикотиков. Новые антимикробные соединения недавно были обнаружены среди метаболитов штаммов ` Acremonium, Cordyceps и Trichoderma.

Целью работы была оценка распространенности среди грибов порядков Eurotiales и Hypocreales способности к продукции антимикотиков. Из 914 штаммов умеренная и высокая антимикотическая активность в отношении тест-культуры A.niger 2K установлена у 38% и 2% штаммов. Среди представителей порядка Eurotiales умеренной и высокой антигрибной активностью обладали 39% и 0,4%, порядка Hypocreales - 52% и 9%. В результате скрининга отобрано 9 штаммов 6 видов рода Trichoderma, продуцирующих внеклеточные антибиотики гидрофобной природы в отношении условно-патогенных грибов, которые могут быть использованы в дальнейших разработках с целью получения новых лекарственных препаратов. Для одного из наиболее активных из отобранных штаммов - T. citrinoviride ВКПМ F-1228 как продуцента мембранно-активных пептидов с антибактериальной, антигрибной активностью. Подобраны оптимальные параметры культивирования и разработан лабораторный регламент получения антибиотиков – пептаиболов.

Продуцент может быть использован в разработках новых медицинских препаратов для лечения микозов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-06260

УДК 579.61.615.33

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FUNGI FROM EUROTIALES AND HYPOCREALES AND SCREENING OF A PEPTAIBOL PRODUCER

Baranova A.A., Kuvarina A.E., Korshun V.A., Kurakov A.V., Sadykova V.S.

GINA Federeal State Budgetary Scientific Institution «Gause Institute of New Antibiotics», Moscow, Russia
119021, Moscow, Russia. Most Pirogovskaya, d.11, p.1
e-mail: anjabaranowa@list.ru

The ability of 914 strains of orders Eurotiales and Hypocreales to form antifungal compounds has been investigated. The strain *T. citrinoviride* VKPM F-1228 has been obtained and procedures for the synthesis of antibiotics, isolation and purification of the peptaibols have been optimized.

Key words: antifungal activity, micromycetes, peptaibols.

Fungi of Eurotiales and Hypocreales have been known as producers of secondary metabolites (chemical compounds/peptides) that are considered to be antifungal antibiotics. Numerous novel antimicrobial compounds have recently been reported among the metabolites of *Acremonium*, *Cordyceps* and *Trichoderma* genera.

This study aims to evaluate the ability of fungi from Eurotiales and Hypocreales to produce the compounds with antifungal activity. From 914 strains moderate and high antimycotic activity against the test culture *A.niger* 2K have been found for 38% of the amount. Representatives of the order Eurotiales with moderate and high antifungal activity have been investigated for 39% and 0.4%, about Hypocreales - 52% and 9%. As a result of screening the 6 strains of the genus Trichoderma hydrophobic nature antibiotics against opportunistic fungi have been isolated. For one of the most active strains *T. citrinoviride* VKPM F-1228 the optimal cultivation parameters for the synthesis of antibiotic secreted by the strain and technologies of their and antibiotic production, including laboratory protocols have been developed. This producer can be used in the development of new drug for the treatment of fungal infections.

This research has been supported by the RFBR, grant № 15-04-06260

УДК 577.21:615.322

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗНООБРАЗНЫХ ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕННОГО В МЕДИЦИНЕ АРТЕМИЗИНИНА ПОСРЕДСТВОМ БИОТЕХНОЛОГИЙ.

Рахманов Б.К.[1], Буриев З.Т.[1], Шапулатов У.М.[1,2], Убайдуллаева Х.А.[1], Шерматов Ш.Э.[1], Ван дер Крол А.[2], Абдурахмонов И.Ю.[1]

[1] Центр Геномики и Биоинформатики Академии Наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан
111215, Ташкентская область, улица Университетская, дом 2
E-mail: bakhtiyor.rakhmanov@gmail.com
[2] Факультет физиология растений, Вагенингенский Университет, Нидерланды,
16, 6700AA Вагенинген, Нидерланды

Открытие артемизинина помогло уменьшению проблем с заболеванием малярией, которое имеет высокие отрицательные показатели в программах ВОЗ. Принимая во внимание наличие артемизинина в незначительном количестве, ученые по всему миру прилагают усилия, чтобы получить его в большем количестве с помощью современных биотехнологий, используя растения и микроорганизмы в качестве объектов исследований.

Ключевые слова: *Artemisia annua*; артемизинин; рак; малярия; биотехнология; программа ВОЗ.

Artemisia annua содержит соединение артемизинин, которое является эффективным противомалярийным лекарством. *Од нако артемизинин остается дорогим лекарством, потому что содержится в растениях в очень малых количествах.* Как СПИД и туберкулез, малярия также считается болезнью с высокой смертностью в мире. Было подсчитано, что страны сталкивающиеся с бременем малярии, имеют негативное влияние их на экономический потенциал развития. Заболевание малярией снизилось после изобретения артемизинина (от 173 млн до 128 млн, 26%), а количество инфицированных пациентов, особенно детей было снижено с 26% до 14%. Препараты на основе вещества артемизинина в настоящее время находятся в центре глобальной борьбы ВОЗ против малярии [1]. В последние десятилетия, была определена терапевтическая активность артемизинина против некоторых раковых клеток, шистосомозов и вирусов, таких как цитомегаловируса человека и гепатита В, С. [2]. На сегодняшний день, артемизинин, исследованиям которого присуждена Международная Нобелевская Премия-2015 года, можно разделить на две большие «горячие» направления такие как: 1) биотехнологические исследования для получения высококонцентрированного артемизинина из некоторых растений и микроорганизмов; 2) клинические исследования для тестирования артемизинина с различными заболеваниями человека. На сегодняшний день артемизинин производится в количестве 232-262 тонн, а спрос на него остается 289 тонн [3]. В ближайшее время спрос на артемизинин может быть значительно увеличен за счет очень низкого выхода артемизинина из *Artemisia annua* и его применения в других методах лечения болезни отдельно от малярии. Хотя артемизинин был обнаружен, но его производство недостаточно для обеспечения и лечения пациентов по всему земному шару. Это означает, что спрос остается более высоким, чем предложение.

Поэтому мы проводим исследования, чтобы получить ценный артемизинин посредством генной инженерии. Наша цель состоит в том, чтобы получить новые сорта сельскохозяйственных культур, которые продуцируют лекарственно ценный артемизинин с высоким выходом используя векторных конструкций специфичных для биосинтеза артемизинина. В этих исследованиях, мы можем узнать и понять функции различных генов, связанных с артемизинином, как и где он продуцируется в растениях. Наилучшие результаты исследования будут способствовать созданию новых стратегий для увеличения производства этого лекарства, которое может быть эффективным и при других заболеваниях. Полученные результаты могут не только снабжать фармакологию артемизинином, но и увеличить экспортный потенциал нашей страны.

Литература:
1. WHO, World Malaria Report, 2014.
2. Efferth T (2007), Willmar Schwabe Award 2006: Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin-from bench to bedside. Planta Med 73:299–309.
3. A2S2 market intelligence, 2012. http://www.a2s2.org/market-data.

UDC 577.21:615.322

RESEARCHES ON DIVERSE RESOURCES TO PRODUCE MEDICINAL VALUABLE ARTEMISININ VIA BIOTECHNOLOGIES

Rakhmanov B.K.[1], Buriev Z.T.[1], Shapulatov U.M.[1,2], Ubaydullayeva Kh.A.[1], Shermatov S.E.[1], Van der Krol A.[2], Abdurakhmonov I.Y.[1]

[1] The Center of Genomics and Bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan
111215, Tashkent region, University Street, 2
E-mail: bakhtiyor.rakhmanov@gmail.com
[2] Department of Plant Sciences, Wageningen University, Netherlands
PO Box 16, 6700AA Wageningen, Netherlands

Discovery of artemisinin have contributed to diminish malaria issues that have negatively higher rates also in WHO programmes. Taking into account availability of artemisinin in low quantity the scientists across the globe are making efforts to reach it in bigger amount employing up-to-date biotechnologies, plants and microorganisms as research objectives.

Key words: *Artemisia annua*; artemisinin; cancer; malaria; biotechnology; WHO programmes.

Artemisia annua contains artemisinin compound, that is an effective antimalarial drug. However, artemisinin

remains as an expensive drug, because it is in extremely low amount in the plant. Like AIDS and tuberculosis, malaria also reckoned a deadly disease in the world. There has been recounted that the countries facing with malaria burden, have negative impact on their economical development potential. Malaria disease had been reduced after invention of artemisinin (from 173 million to 128 million, 26%), and infected patients' number, especially in children had been lowered from 26% to 14%. Formulations based on these drugs are now at the heart of the WHO's global fight against malaria [1]. Last decades, there have been determined the therapeutically activity of artemisinin against certain cancer cells, schistosomiasis and viruses like human cytomegalovirus, and hepatitis B, C viruses [2].Today artemisinin, The International Nobel Prize-2015 bearer compound, related investigations can be divided into two large "hot" directions as 1) biotechnological studies to produce high yielding artemisinin in several plants and microorganisms, and 2) clinical studies to test artemisinin in variety human diseases. Nowadays artemisinin is produced in amount of 232-262 tons, but demand for it stays 289 tons [3]. In near future demand for artemisinin can be increased significantly due to very low yield of artemisinin in *Artemisia annua* and its application in another disease treatments apart from malaria. Although artemisinin were discovered, its production is not enough for providing and treating patients across the globe. It means, demand remains more higher than supply.

Therefore we are conducting investigations to acquire valuable artemisinin through genetic engineering. Our goal is to obtain new crop varieties that produce valuable medicinal drug artemisinin with high yield using vector constructions, which are specific for artemisinin biosynthesis. In this study, we can learn and understand the functions of artemisinin related different genes, how and where it is produced within the plant. The best research results will promote us to make new strategies to increment of that medicinal drug production, which can be effective in other diseases. Obtained results cannot only supply the pharmacology with artemisinin, but it would also increase the export potential of our country.

References:
1. WHO, World Malaria Report, 2014.
2. Efferth T (2007), Willmar Schwabe Award 2006: Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin-from bench to bedside. Planta Med 73:299–309.
3. A2S2 market intelligence, 2012. http://www.a2s2.org/market-data.

УДК 604:615:582.28

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОЗИДНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ГРИБА PHALLUS IMPUDICUS

Чупров А.И., Разин А.Н., Кулырова А.В.

НПО «Биолюкс»
198054, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Белы Куна, д. 34.
e-mail: andrew6kot6@gmail.com

Впервые была выделена цереброзидная составляющая гриба *Phallus impudicus*. На данный момент продолжаются работы по ее изучению и определению различных видов биологической активности.

Ключевые слова: цереброзиды, Phallus impudicus, биологическая активность, капиллярный электрофорез.

В современной биотехнологии достаточно небольшое количество работ и исследований уделяется исследованию цереброзидов, поэтому до конца не исследованы их функции. При этом, имеющиеся исследования показали, что цереброзиды играют важную роль для человеческого организма и их недостаток сопутствует таким заболеваниям как инсулиновая кома, общий столбняк, газовая гангрена, при отравлении стрихнином. Так же цереброзиды используют при различных воспалительных процессах [1,4]. В большинстве своем цереброзиды находятся в мозговых тканях млекопитающих, но в последнее время были получены цереброзиды из тканей различных грибов, например, *Ceriporiopsis subvermispora* [5] и *Cordyceps militaris* [4]. В данной работе в качестве объекта был выбран гриб *Phallus impudicus*, ввиду своей доступности, простоты культивирования и скорости роста [3].

Для экстракции цереброзидов из гастеромицетов не предусмотрено стандартной методики, поэтому за основу была взят метод Фолча [2], модифицированный под специфику объекта и предмета исследования. Выход цереброзидной составляющей с различными примесями на начальной стадии очистки соста-

вил в среднем 4,93 г (±0.01 г)/ 100 г сухой измельченной биомассы гриба. На данный момент проводятся дальнейшие исследования продукта. Предполагается, что при дальнейшей очистке полученного промежуточного продукта выход цереброзидов составит порядка 70-75% от неочищенной смеси веществ.

Сейчас проводятся исследование промежуточного продукта экстракции с помощью капиллярного электрофореза. Так же организовывается работа по исследованию противовоспалительной, геропротекторной, противоопухолевой и антиокидантной активностей полученного промежуточного продукта и очищенной цереброзидной составляющей.

Литература:
1. *Chiu C.P., Liu S.C., Tang C.H., Chan Y., El-Shazly M., Lee C.L., Du Y.C., Wu T.Y., Chang F.R., Wu Y.C. Anti-inflammatory Cerebrosides from Cultivated Cordyceps militaris//J Agric. Food Chem. 2016 Feb 24;64(7):1540-8*
2. *Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues//J Biol. Chem. 1957 May;226(1):497-509*
3. *Khare, B. Some Gasteromycetes from Uttar Pradesh India // Indian Phytopahtology. 1976 29 (1): 34–38*
4. *McCloskey S., Noppawan S., Mongkolthanaruk W., Suwannasai N., Senawong T., Prawat U. A new cerebroside and the cytotoxic constituents isolated from Xylaria allantoidea SWUF76//Nat. Prod. Res. 2016 Nov 20:1-9*
5. *Nishimura H., Yamaguchi D., Watanabe T. Cerebrosides, extracellular glycolipids secreted by the selective lignin-degrading fungus Ceriporiopsis subvermispora //Chem. Phys. Lipids. 2017 Jan 3;203:1-11*

.....

UDC 604:615:582.28

RESEARCH OF CEREBROSIDE COMPONENT OF FUNGI PHALLUS IMPUDICUS

Chuprov A.I., Razin A.N., Kulyrova A.V.

NPO «BIOLUX»
198054, Russia, Saint-Petersburg, Bely Kuna st., 34
e-mail: andrew6kot6@gmail.com

Cerebroside component was first time isolated from fungi *Phallus impudicus*. At the moment, work is continuing on the study and definition of different types of biological activity.

Key words: cerebrosides, Phallus impudicus, biological activity, capillary electrophoresis.

In modern biotechnology a relatively small number of works and studies is paid to the study of cerebrosides, so their functions does not studied well. At the same time, existing studies showed that cerebrosides are important for the human body and their deficiency is accompanied with such diseases as insulin coma, total tetanus, gas gangrene, strychnine poisoning. Cerebrosides are also used in various inflammatory processes [1,4]. The majority of cerebrosides are found in the brain tissue of mammals, but recently have been obtained cerebrosides from the tissues of various fungi, for example, *Ceriporiopsis subvermispora* [5] and *Cordyceps militaris* [4]. In this work the as the object has been selected fungi *Phallus impudicus*, because of its availability, simple cultivation and speed of growth [3].

For extraction of cerebrosides from gasteromycetes there is no standard methodology, and our method was based on the Folch method [2], modified to the specifics of the object and subject of research. Output of cerebrosides component with different impurities on the initial stage of purification amounted to an average of 4.93 g (±0.01 g)/ 100 g of dry powdered biomass of the fungus. Currently conducting further studies of the product. It is assumed that after the further purification of the obtained intermediate product cerebrosides output will be about 70-75% of the crude mixture of substances.

Now carried out the study of intermediate extraction of the product by capillary electrophoresis. Similarly organized the work on the study of anti-inflammatory, geroprotective, and antitumor and antioxidant activities of the obtained intermediate product and purified cerebrosides component.

References:
1. *Chiu C.P., Liu S.C., Tang C.H., Chan Y., El-Shazly M., Lee C.L., Du Y.C., Wu T.Y., Chang F.R., Wu Y.C. Anti-inflammatory Cerebrosides from Cultivated Cordyceps militaris//J Agric. Food Chem. 2016 Feb 24;64(7):1540-8*
2. *Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues//J Biol. Chem. 1957 May;226(1):497-509*
3. *Khare, B. Some Gasteromycetes from Uttar Pradesh India // Indian Phytopahtology. 1976 29 (1): 34–38*
4. *McCloskey S., Noppawan S., Mongkolthanaruk W., Suwannasai N., Senawong T., Prawat U. A new cerebroside and*

the cytotoxic constituents isolated from Xylaria allantoidea SWUF76//Nat. Prod. Res. 2016 Nov 20:1-9
5. *Nishimura H., Yamaguchi D., Watanabe T. Cerebrosides, extracellular glycolipids secreted by the selective lignin-degrading fungus Ceriporiopsis subvermispora //Chem. Phys. Lipids. 2017 Jan 3;203:1-11*

УДК 546.26+661.183+661.12.01

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМЕРМОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫХ СОРБЕНТОВ С БИОСПЕЦИФИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

М.С. Дроздецкая [1], Л.Г. Пьянова [1,2], А.В. Седанова [1]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем переработки углеводородов Сибирского отделения Российской академии наук (ИППУ СО РАН), г.Омск, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный технический университет» (ОмГТУ), г.Омск, Россия
644018, г. Омск-18, ул. 5-я Кордная,29
e-mail: medugli@rambler.ru

Разработаны углеродные сорбенты, модифицированные олигомерами гидроксикислот. Изучены их физико-химические и медико-биологические свойства. Доказано пролонгированное действие полученных материалов, их высокая эффективность и биоспецифичность по отношению к патогенным микроорганизмам.

Ключевые слова: углеродный сорбент, гидроксикислота, поликонденсация, биоспецифические свойства.

Сорбционные материалы играют важную роль в медицине. Обладая развитой пористой структурой углеродные материалы нашли применение при детоксикации организма в качестве гемо-, энтеросорбентов и аппликационных изделий, при вульнеросорбции. На сегодняшний день актуальным направлением в развитии методов сорбционной терапии становится разработка и использование биоспецифических сорбентов.

В ИППУ СО РАН активно развивается данное направление, связанное с разработкой и исследованием модифицированных углеродных сорбентов с антибактериальными, противогрибковыми, противовоспалительными свойствами и др. на основе ранее разработанных материалов с целью расширения области их использования [1, 2, 5]. В качестве модификаторов используются биологически активные вещества с биоспецифическими свойствами, разрешенные к применению в медицине, в частности α-гидроксикислоты (гликолевая, молочная кислоты) [3-5].

Цель данной работы - разработка углеродных сорбентов, модифицированных олигомерами гидроксикислот и изучение их физико-химических и медико-биологических свойств.

В институте синтезированы гранулированные углеродные сорбенты, модифицированные олигомерами/сополимером гидроксикислот [3-5]. Синтез включает два основных этапа: 1) пропитка углеродного сорбента водными растворами гидроксикислот; 2) многостадийная продолжительная термообработка пропитанных образцов (поликонденсация). Полученные полимермодифицированные углеродные сорбенты обладают следующими физико-химическими характеристиками: количество нанесенных олигомеров гидроксикислот 10-50 %, наличие мезопористой структуры и удельной площади поверхности не более 250 м²/г, общего объема пор не более 0,4 см³/г.

Доказано пролонгированное действие полученных материалов. Изучен процесс десорбции олигомеров/сополимера гидроксикислот с поверхности полимермодифицированных сорбентов в водном (физиологический раствор NaCl) растворе различными методами: ЯМР спектроскопия 1Н, pH-метрия, низкотемпературная адсорбция азота, спектрофотометрический анализ. Определено количество десорбируемых в раствор олигомеров/сополимера гидроксикислот спектрофотометрическим методом с использованием красителя родамина Ж (λ=528 нм). Установлено, что при контакте полимермодифицированных образцов с физиологическим раствором NaCl равновесие наступает через 30 суток. Показано, что в водном растворе протекает гидролиз олигомерных цепей гидроксикислот, нанесенных на углеродный сорбент, по сложноэфирным связям до моно-, ди- и тримеров. При контакте полимермодифицированных образцов с физиологическим раствором в течение данного времени в растворе обнаружено

до 2,5-2,6 мг/мл гидроксикислот, процесс десорбции сопровождается увеличением удельной площади поверхности образцов, снижением количества нанесенных на поверхность образцов олигомеров/сополимера гидроксикислот и величины pH.

Для оценки адгезивных свойств разработанных полимермодифицированных материалов исследовано их взаимодействие с желатином (биоадгезив, маркер токсинов средней молекулярной массы, ~100кДа). Установлено, что из модифицированных сорбентов наибольшей адсорбционной способностью обладает образец, модифицированный олигомером гликолевой кислоты.

По результатам стендовых микробиологических испытаний полимермодифицированных сорбентов «in vitro» в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ доказана их высокая эффективность и биоспецифичность по отношению к резистентным патогенным бактериям, дрожжеподобным грибам, бактериально-грибковым ассоциациям. Установлено, что высокие антибактериальные и противогрибковые свойства синтезированных сорбентов сохраняются в течение 6 мес.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы «СТАРТ» (договор №1407ГС1/22703 от 20.07.2016).

Литература:

1. *Суровикин В.Ф., Пьянова Л.Г., Лузянина Л.С. Новые гемо- и энтеросорбенты на основе нанодисперсных углерод-углеродных материалов // Российский химический журнал. - 2007. -Т.LI, №5. - С.159-165.*
2. *Баринов С.В., Герунова Л.К., Тирская Ю. И., Пьянова Л. Г., Бакланова О. Н., Лихолобов В. А. Разработка углеродных сорбентов и перспективы их применения в акушерской практике: монография. – Омск : Изд-во ИП Макшеевой Е.А., 2015. - 132 с.: ил.*
3. *Пьянова Л.Г., Бакланова О.Н., Дроздов В.А., Лихолобов В.А., Седанова А.В., Дроздецкая М.С. Разработка углеродных модифицированных сорбентов медицинского назначения // Химия в интересах устойчивого развития. - 2014. - Т.22. № 6. - С. 633-641.*
4. *Пьянова Л. Г., Лихолобов В.А., Дроздов В. А., Седанова А. В., Дроздецкая М.С., Герунова Л.К., Новиков Д.Г. Исследование особенностей модифицирования углеродного сорбента молочной и гликолевой кислотами с их последующей поликонденсацией // Физикохимия поверхности и защита материалов. - 2016. - Т.52. №3. - С.278-284.*
5. *P'yanova L.G., Sedanova A.V., Drozdetskaya M.S. Synthesis and research of modified carbon sorbents with hydroxy acids // Procedia Engineering. - 2016. - V.152. P. 639 – 646. doi: 10.1016/j.proeng.2016.07.668*

UDK 546.26+661.183+661.12.01

THE DEVELOPMENT AND STUDY OF POLYMER-MODIFIED CARBON SORBENTS WITH BIOSPECIFIC PROPERTIES

M.S. Drozdetskaya[1], L.G. P'yanova[1,2], A.V. Sedanova[1]

[1]Institute of Hydrocarbons Processing, Siberian Branch Russian Academy of Sciences
[2]Omsk State Technical University
644018, Omsk, Russia, 29, 5-Kordnaya
e-mail: medugli@rambler.ru

Carbon sorbents modified with oligomers of hydroxy acids have been developed. Their physicochemical and medical-biological properties were studied. The prolonged action of the produced materials, their high efficiency and biospecificity to pathogenic microorganisms were revealed.

Key words: carbon sorbent, hydroxy acid, polycondensation, biospecific properties.

Sorption materials play an important role in medicine. Having a developed pore structure, carbon materials are used for detoxification of the organism as hemo- or enterosorbents and application products as well as for vulnerosorption. The development and use of biospecific sorbents become a topical approach for devising the sorption therapy methods.

The indicated approach is being developed at the Institute of Hydrocarbons Processing SB RAS: modified carbon sorbents with antibacterial, antifungal and anti-inflammatory features are studied and synthesized using the earlier devised materials in order to extend their application field [1, 2, 5]. The modifiers are represented by biologically active substances with biospecific properties that are approved for use in medicine, in particular,

α-hydroxy acids (glycolic and lactic acids) [3-5].

The goal of the work was to create carbon sorbents modified with oligomers of hydroxy acids and investigate their physicochemical and medical-biological properties.

Granular carbon sorbents modified with oligomers/copolymer of hydroxy acids were synthesized at the Institute [3-5]. The synthesis includes two main stages: 1) impregnation of a carbon sorbent with aqueous solutions of hydroxy acids, and 2) a long-term multistep thermal treatment of the impregnated samples (polycondensation). The resulting polymer-modified carbon sorbents possess the following physicochemical characteristics: the amount of introduced hydroxy acid oligomers 10-50 %, the mesoporous structure, specific surface area not higher than 250 m^2/g, and total pore volume not greater than 0.4 cm^3/g.

The prolonged action of the synthesized materials was demonstrated. The desorption of oligomers/copolymer of hydroxy acids from the surface of polymer-modified sorbents in an aqueous solution (saline solution of NaCl) was studied by various methods: ^{1}H NMR spectroscopy, pH-metering, low-temperature nitrogen adsorption, and spectrophotometric analysis. The amount of oligomers/copolymer of hydroxy acids desorbed to the solution was estimated spectrophotometrically using rhodamine G (λ = 528 nm). It was found that upon contacting the polymer-modified samples with saline solution of NaCl the equilibrium is established in 30 days. In the aqueous solution, oligomeric chains of hydroxy acids deposited on the carbon sorbent were shown to hydrolyze by means of ester bonds to mono-, di- and trimers. After contacting the polymer-modified samples with saline solution for the indicated time, up to 2.5-2.6 mg/ml of hydroxy acids was detected in the solution. The desorption was accompanied by an increase in specific surface area of the samples and a decrease in the pH value and amount of oligomers/copolymer of hydroxy acids deposited onto the surface.

To assess the adhesion properties of the developed polymer-modified materials, their interaction with gelatin (a bioadhesive and a medium molecular weight toxin marker, ~100 kD) was examined. The sample modified with a glycolic acid oligomer showed the highest adsorptivity among the modified sorbents.

In vitro bench microbiological testing of the polymer-modified sorbents at the Omsk State Medical University demonstrated their high efficiency and biospecificity to resistant pathogenic bacteria, yeast-like fungi and bacterial-fungal associations. It was found that high antibacterial and antifungal properties of the synthesized sorbents are retained for 6 months.

The study was financially supported by the Foundation for Promoting the Development of Small Enterprises in Scientific and Technical Sphere within the START program (Agreement No. 1407GS1/22703 of 20.07.2016).

References:

1. *Surovikin V.F., P'yanova L.G., Luzyanina L.S. Novye gemo- i ehnterosorbenty na osnove nanodispersnyh uglerod-uglerodnyh materialov // Rossijskij himicheskij zhurnal. - 2007. -T.LI, №5. - S.159-165.*
2. *Barinov S.V., Gerunova L.K., Tirskaya YU. I., P'yanova L. G., Baklanova O. N., Liholobov V. A. Razrabotka uglerodnyh sorbentov i perspektivy ih primeneniya v akusherskoj praktike: monografiya. – Omsk : Izd-vo IP Maksheevoj E.A., 2015. - 132 s.: il.Пьянова Л.Г., Бакланова О.Н., Дроздов В.А., Лихолобов В.А., Седанова А.В.,*
3. *P'yanova L.G., Baklanova O.N., Drozdov V.A., Liholobov V.A., Sedanova A.V., Drozdeckaya M.S. Razrabotka uglerodnyh modificirovannyh sorbentov medicinskogo naznacheniya // Himiya v interesah ustojchivogo razvitiya. - 2014. - T.22. № 6. - S. 633-641.*
4. *P'yanova L. G., Likholobov V. A., Drozdov V. A., Sedanova A. V., Drozdetskaya M. S., Gerunova L. K., Novikov D. G. Investigation of the Peculiarities of Modification of Carbon Sorbent by Lactic and Glycolic Acid with Their Subsequent Polycondensation // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. Vol. 52. 2016. N. 3, P. 431-437.*
5. *P'yanova L.G., Sedanova A.V., Drozdetskaya M.S. Synthesis and research of modified carbon sorbents with hydroxy acids // Procedia Engineering. 2016. V.152. P. 639 – 646.*

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 602-027.236

ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАЭФФЕКТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ РЕНАТУРАЦИИ ИНТЕРФЕРОНА

Епанчинцев А.А., Волкоморов В.В., Стронин О.В.

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Томск «НПО «Вирион»
634040, г. Томск, ул. Ивановского, 8
e-mail: a.a.epanchintsev@gmail.com

Разработан метод ультраэффективной хроматографии для оценки результатов высокопроизводительного скрининга условий проведения рефолдинга рекомбинантного интерферона. Полученные данные позволили кратно увеличить выход продукта на этапе ренатурации.

Ключевые слова: рефолдинг; интерферон альфа-2b; ультраэффективная жидкостная хроматография.

Одним из ограничений продукции рекомбинантных биофармпрепаратов в прокариотах является необходимость повторной ренатурации белков, накапливающихся в виде телец включения. Эффективность процесса рефолдинга является определяющим фактором производительности всего технологического процесса. К сожалению, нет универсальных рецептов проведения рефолдинга, подходящие условия ренатурации должны быть определены для каждого отдельного белка.

Для выбора оптимальных параметров проведения рефолдинга мы разработали двухэтапный высокопроизводительный метод скрининга. Первым шагом является общий скрининг, где исследуются различные компоненты ренатурационного буфера, способные повысить растворимость белка на этапе внесения телец включения (всего 96 вариантов, в формате планшета). При этом тестировались следующие соединения: «хаотропный» агент (мочевина в концентрациях 0 - 0,8 М); ингибиторы агрегации (1 М глицин, 1 М аргинин, 1М трис, 0,05 % SDS, 0,05% TWEEN 80); стабилизаторы (5% сахароза, 5% ПЭГ 4000, 5% глицерин) и их комбинации.

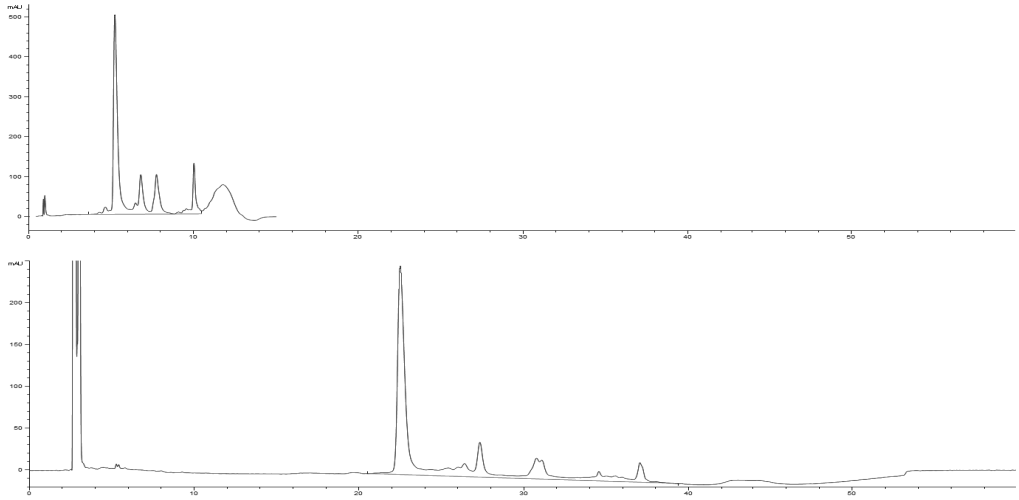


***Рис.1**. Сравнение времени анализа ренатурированного ИНФ методом ОФ-ВЭЖХ на сорбентах 1,8 мкм (вверху) и 5 мкм (внизу).*

Во втором блоке эксперимента, также в формате планшета, были изучены 96 вариантов значений редокс-потенциала буфера для рефолдинга, обеспечивающих наибольший выход интерферона с корректно замкнутыми дисульфидными связями. В эксперименте была оценена возможность применения двух окислительно-восстановительных пар: GSSG/GSH и цистеин/цистин, при трех значениях pH рабочего буфера 7,5/8,5/9,5. При этом, для каждой группы условий было исследовано 16 разных соотношений окислен-

ной и восстановленной форм дисульфидного агента.

Содержание интерферона после проведения ренатурации определяли методом ультраэффективной хроматографии с использованием сорбента 1,8 мкм, что привело к четырехкратному снижению времени единичного анализа (рис. 1). Таким образом, с использованием хроматографа Agilent 1290 определение концентрации интерферона во всех 192 вариантах условий рефолдинга было выполнено в течение двух суток в автоматическом режиме.

После выбора оптимальных параметров и проведения масштабирования концентрация интерферона на этапе ренатурации составляла не менее 0,25 г/л, при нагрузке 2 грамма сырой массы телец включения на 1 литр буфера для рефолдинга. Чистота полупродукта (ОФ-ВЭЖХ) перед первой стадией хроматографической очистки достигала 70 %.

UDC 602-027.236

OPTIMIZATION OF THE INTERFERON REFOLDING CONDITIONS APPLYING ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Epanchintsev A.A., Volkomorov V.V., Stronin O.V.

«Virion» Tomsk Branch of the Federal State Unitary Company «Microgen»
634040, Tomsk, 8 Ivanovskogo str
e-mail: a.a.epanchintsev@gmail.com

In this paper we describe the design of high throughput screening for optimal recombinant interferon refolding conditions. The results of the screening were evaluated with the usage of ultra-high performance liquid chromatography. Applying of the chromatography analysis method developed by our team resulted in the significantly increased renaturation yield of target protein.

Key words: refolding, interferon α-2b, ultra-high performance liquid chromatography.

Expression of recombinant protein in prokaryotic host cells may result in the formation of non-soluble intracellular aggregates known as inclusion bodies. Further production of recombinant biopharmaceuticals requires solubization of this aggregates and renaturation of target protein. The efficiency of this process determines productivity of all the manufacturing process. Therefore suitable refolding conditions should be carefully screened and optimized individually for each target polypeptide in order to maximize yields of active product.

For that purpose we developed two-stage high throughput screening method. The first step of the method includes screening of common renaturation conditions such as influence of different refolding buffer composition on protein solubility during solubilization of inclusion bodies and their introduction into reaction mixture. In total, 96 variants of buffer compositions were investigated in 96-well plate format.

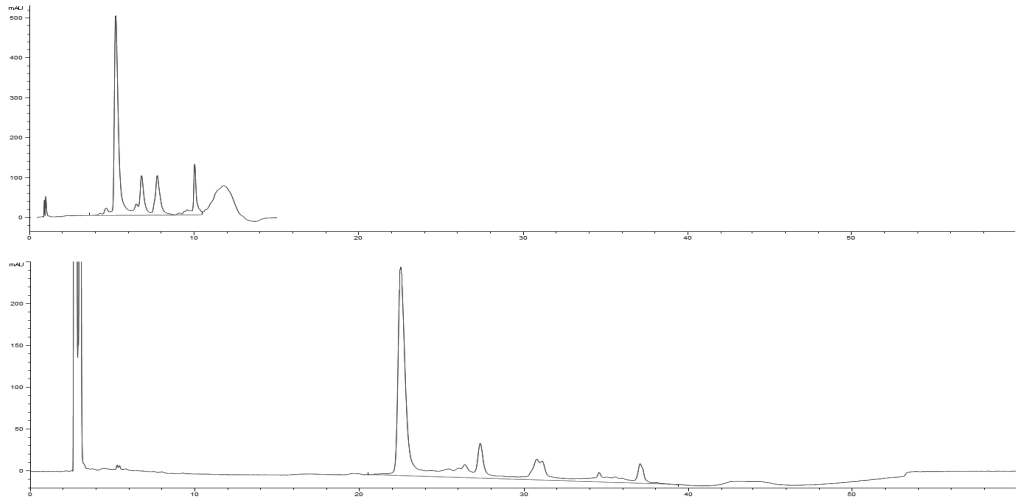


Fig. 1. *Comparison of ultra-high performance liquid chromatography analysis time unit within 1.8 μm (upper) and 5 μm sorbent (lower).*

The following reaction components and their combinations were tasted: Urea as a chaotropic agent (0-0,8 M), 1 M glycine, 1 M arginine, 1M Tris, 0,05 % SDS, 0,05% TWEEN 80 as aggregation inhibitors and 5% sucrose, 5% PEG 4000, 5% glycerol as stabilizers.

In order to maximize the yields of native form of interferon we investigated 96 variants of redox buffer during the second stage of the experiment. Sixteen concentration variants of two different redox pairs (GSSG/GSH and cystine/cysteine) and three pH values of folding buffer were tasted at 96-well plate scale using the best solubilization condition.

The concentration of properly folded interferon α-2b in the solution was estimated with ultra-high performance liquid chromatography. The experiment was performed within 1.8 μm sorbent which led to a 4-fold decrease in analysis time unit (Fig. 1). As a result the measuring of target protein concentration was carried out in two days in automatic mode in all 192 samples of refolding solution.

Resulted yield of interferon obtained after optimization of refolding conditions and scaling was not less than 0.25 gram per liter of renaturation mixture while total amount of intrusion bodies introduced into refolding buffer was 2 gram per liter. The intermediate product prior the first stage of chromatography purification was 70% pure by RP-HPLC analysis.

УДК 615.074

РАЗРАБОТКА СТАНДАРТА ДНК КЛЕТОК VERO ДЛЯ КОНТРОЛЯ БИОФАРМПРЕПАРАТОВ

Стронин О.В., Теплова Н.В.

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Томск «НПО «Вирион»
634040, г. Томск, ул. Ивановского, 8
e-mail: stronin@mail.ru

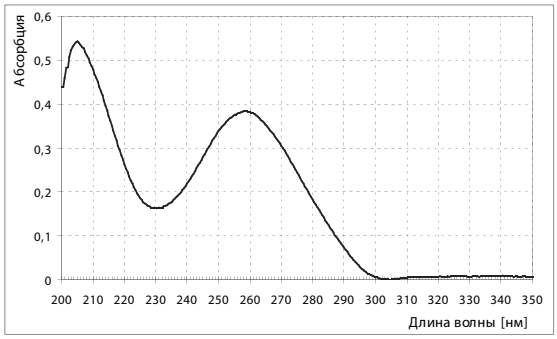
Разработан метод изготовления и аттестации стандарта ДНК клеток линии Vero. Полученный стандарт может быть использован для контроля остаточной ДНК в различных биофармацевтических препаратах, использующих данную линию в качестве производственной.

Ключевые слова: стандарт; аттестация; ДНК; клетки Vero.

Контроль содержания ДНК клеток-продуцентов стал обязательным для многих препаратов, производимых с использованием линий перевиваемых эукариотических клеток, прокариот и дрожжей. Это могут быть как препараты, полученные с помощью техники рекомбинантных ДНК, так и давно выпускаемые вирусные вакцины. Клетки линии Vero уже используются в производстве вакцин против бешенства, герпеса, гриппа и этот список постоянно расширяется. Поэтому создание стандарта ДНК клеток Vero, как основы метода контроля её содержания, является актуальной задачей.

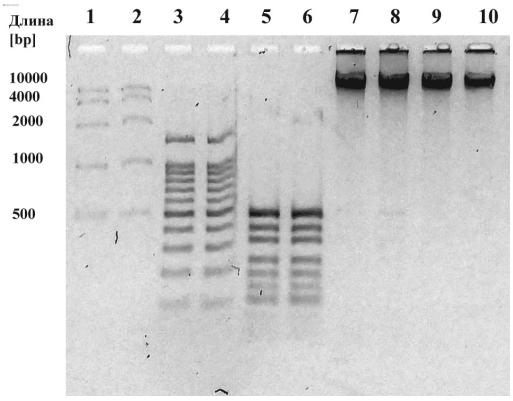
Биомассу клеток Vero получали культивированием в среде Eagle-MEM с L-глутамином и 10 % ЭТС. Клетки отмывали от среды культивирования и лизировали трехкратным замораживанием-оттаиванием. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, с использованием Рибонуклеазы I и Протеиназы Е. Осадок ДНК разводили в ТЕ-буферном растворе. Концентрат хранили при температуре минус 18,0–20,0°С, использовали для аттестации и приготовления стандарта ДНК клеток линии Vero.

На этапе аттестации стандарта оценивали концентрацию, степень чистоты и фракционный состав раствора ДНК. Исследование проводили параллельно в двух лабораториях. Концентрацию и степень чистоты определяли методом спектрофотомерии. Изучали форму спектра поглощения раствора ДНК в диапазоне длин волн от 190,0 до 350,0 нм, а также абсорбцию при длинах волн 260 нм; 280 нм, 320 нм (измеряли десятикратно). Измерения производили в течение трех дней, с использованием трех разных спектрофотометров (UVmini-1240; UVmini-1280; UV-1800 Shimadzu, Япония). Концентрацию рассчитывали как $C=(Abs_{260}-Abs_{320})\times 50$; критерий чистоты как $P=Abs_{260}/Abs_{280}$, где С – концентрация ДНК, [мкг/мл]; Р – критерий чистоты; Abs_{260} ,Abs_{320}, Abs_{280} – абсорбция раствора при длине волны 260, 320, 280нм соответственно.



Среднее значение концентрации ДНК в концентрате составило 1136,67±56,79 мкг/мл; критерий чистоты – 1,79±0,09 (при норме от 1,7 до 2,0); форма спектра, соответствовала форме спектра раствора ДНК высокой степени чистоты (рис.1).

***Рисунок 1**. Спектр поглощения стандарта ДНК клеток Vero.*



Фракционный состав раствора ДНК изучали методом электрофореза в 2,0 % агарозном геле окрашенном бромистым этидием (Рис.2).

***Рисунок 2.** Агарозный гель-электрофорез ДНК клеток Vero: дорожка 1, 2, 3, 4, 5, 6 – маркеры длин фрагментов ДНК, дорожка 7, 8, 9, 10 - образцы ДНК Vero.*

В ходе анализа было показано, что 70% составляла ДНК с длиной фрагментов около 12000 п.н., 30% составляет высокомолекулярная фракция.

Для контроля подлинности использовали ПЦР с набором resDNASEQ®Quantitative Vero DNA kit, (Applied Biosystems, США), амплификатор Rotor-Gene 6000, (Corbett Life Science, Австралия). Результаты контроля подтвердили наличие ДНК Vero в ожидаемой концентрации.

Входе работ был оптимизирован состав стабилизатора для сублимации. Главным требованием к нему было минимальное влияние на результаты ПЦР.

Аттестованный раствор ДНК разводили в стабилизирующем растворе до концентрации 5,0 мкг/мл, разливали по 0,5 мл и сублимировали. После сублимации потеря в массе при высушивании составила 0,6%, точность розлива – 2,6% (норма до 3,0%).

Т.о. был разработан, произведен и аттестован стандартный образец ДНК клеток Vero, который можно использовать при проведении контролей биофармацевтических препаратов на содержание остаточной ДНК клеток-продуцентов методами количественной ПЦР, ДНК-гибридизации и другими.

УДК 615.074

DEVELOPMENT OF VERO CELL DNA STANDARD FOR BIOPHARMACEUTICALS CONTROL

Stronin O.V., Teplova N.V.

Federal State Unitary Company "Microgen " of the Health Ministry of The Russian Federation, Branch in Tomsk
634040, Tomsk, 8 Ivanovskogo str
e-mail: stronin@mail.ru

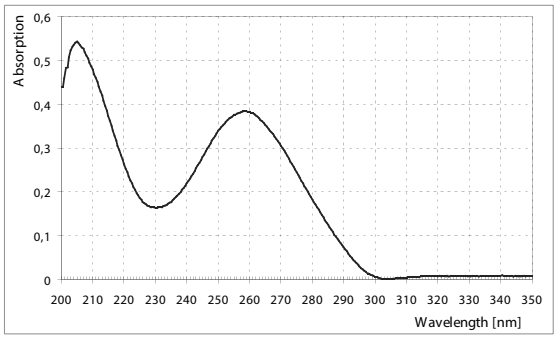
In this paper we describe the methods for production and qualification of Vero-cell DNA standard. The standard can be used for residual Vero-cell DNA control in various biopharmaceuticals, manufactured by the cell-line.

Key words: standard; qualification; DNA; Vero-cells.

Control of residual host-cell DNA is necessary now for many biopharmaceuticals, which manufactured by continued cell lines, prokaryotes and yeasts. These are as recombinant proteins so conventional virus vaccines. Vero-cells are used for production of vaccines against rabies, herpes simplex, influence and its application list is expanding. So standard of Vero-cell DNA development is important task.

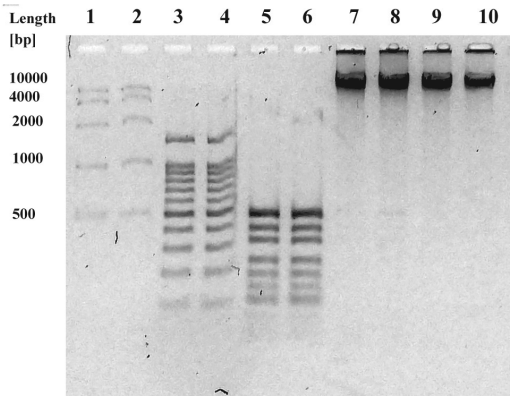
Vero cells were obtained by cultivation in *Eagle-MEM* medium with both L-glutamine and 10% fetal bovine serum. Cells were washed and destroyed by 3-fold freezing-thawing. DNA was extracted by phenol-chloroform method. Both ribonuclease I and pronase E were used for remove proteins and RNA contamination. DNA precipitate was diluted in Tris-EDTA buffer solution. The DNA concentrate was stored at -18-20ºC and was used for production and qualification of DNA standard.

For qualification we have evaluated DNA concentration, its purity and fragments length. The study was made in two laboratories. Both DNA concentration and purity were evaluated by spectrophometry. Spectrum at wavelengths from 190 to 350 nm and absorption at 260, 280, 320 nm 10-fold were measured during 3 days by 3 different spectrophotometers (*UVmini-1240*; *UVmini-1280*; *UV-1800 Shimadzu*). Concentration was calculated as $C=(Abs_{260}-Abs_{320})\times 50$; purity was calculated as $P=Abs_{260}/Abs_{280}$, where C – DNA concentration, [µg/ml]; P – puruty; Abs_{260}, Abs_{320}, Abs_{280} – absorption at 260, 320, 280 nm.



Picture 1. *Absorption spectrum of Vero-cell DNA solution.*

Mean DNA concentration was 1136,67±56,79 µg/ml; purity was 1,79±0,09 (limit is 1,7-2,0); spectrum comply with high purity DNA spectrum (pic.1).



Picture 2. *Electrophoresis of Vero-cell DNA in agarose gel: lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 – DNA ladders; lanes 7, 8, 9, 10 – Vero-cell DNA samples.*

Size range of DNA was studied by electrophoresis in 2% agarose gel with ethidium bromide (pic.2).

The analyzes showed that 70% DNA have length near 12000 bp, 30% DNA was high-molecular.

For identity control we used qPCR by *resDNASEQ®Quantitative Vero DNA kit* (*Applied Biosystems*), thermocycler *Rotor-Gene 6000* (*Corbett Life Science*). The results indicated Vero-cell DNA origin in due concentration.

Stabilizer solution for sublimation was optimized too. Maine request for its was minimal influence on PCR results.

Qualified DNA solution was diluted in stabilizer to 5 µg/ml, dispensed into vials (0,5 ml each) and freeze-dred. After freeze-drying residual humidity was 0,6%, filling precision was 2,6% (limit is before 3%).

So, Vero-cell DNA standard was developed, produced and qualified. The standard can be used for residual DNA determination in biopharmaceuticals by qPCR, DNA-hybridization and other assays.

УДК 619:615:576

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ARTHROSPIRA FUSIFORMIS (CYANOPROKARYOTA) ИЗ ОЗЕРА СОЛЕНОЕ Г. ОМСКА

Водолага В.С., Бойко Т.В. Баженова О.П., Коновалова О.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», г. Омск, Россия
644074, Омск, Институтская площадь, 1
e-mail: valya.vodolaga-94@mail.ru

При исследовании озера Солёное, расположенного на территории г. Омска, обнаружена массовая вегетация цианобактерии Arthrospira fusiformis (артроспира, спирулина), что открывает перспективы ее использования в качестве источника ценного биологического сырья.

Ключевые слова: артроспира, спирулина, биоресурс, токсичность.

При изучении фитопланктона водоемов, расположенных на территории города Омска, в озере Соленом была найдена цианобактерия Arthrospira fusiformis (Woronich.) Komárek et Lund (=Spirulina fusiformis Woronich.), вызывающая в теплое время года «цветение» воды. Интенсивное развитие артроспиры дает возможность использования озера Соленого в качестве источника ценного биологического сырья. Проведенный анализ сырой фитомассы артроспиры урожая 2010–2011 годов показал её высокую кормовую ценность: массовая доля протеина составила 32,8–46,06%; фосфора – 0,4–0,48%; кальция – 0,24–0,64%; золы – 28,4–45,4%; клетчатки – 21,0–38,7%; жира – 0,91–0,97; наибольшее содержание в золе фитомассы установлено для MgO – 16,3 масс%; CaO – 7,81 масс% и Fe2O3 – 2,23 масс%. По содержанию регламентируемых в пищевых продуктах токсикантов фитомасса артроспиры из озера Солёного полностью соответствует установленным нормативам [1].

В августе 2016 года из озера Соленое была отобрана фитомасса артроспиры для проведения токсикологических экспериментов на животных. Замороженную фитомассу артроспиры скармливали крысам в дозе 1,0 и 2,0 г/кг массы ежедневно в течение двух недель. Животные активно поедали артроспиру, весь период наблюдения были активными, изменений в работе желудочно-кишечного тракта не установлено. При анализе динамики массы тела крыс опытных групп регистрировали повышении показателя на 2 % и на 5 % –соответственно. При анализе гематологических показателей выраженных изменений не отмечали. У некоторых животных регистрировали снижение содержания гемоглобина и эритроцитов, что свидетельствует о развитии гипопластической анемии. При анализе показателей лейкоцитарной реакции венозной крови у контрольных и опытных животных достоверных изменений по сравнению с фоновыми и контрольными значениями обнаружено не было. Абсолютное и относительное содержание лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов у крыс обеих опытных групп, оставались на уровне контрольных величин. Аналогичную закономерность наблюдали при анализе показателей тромбоцитарного звена: абсолютное количество тромбоцитов у крыс контрольной группы составило 831,5×109/л, у крыс первой опытной группы – 823,2×109/л, у крыс второй опытной группы – 821,8×109/л. Отличий в активности миелопероксидазы в гранулоцитах крови крыс опытных групп отмечено не было.

Развитие гипопластической анемии у животных опытных групп, возможно, является следствием накопления металлов в организме, что может быть обусловлено применением в эксперименте сырой фитомассы артроспиры, непосредственно отбираемой в озере Соленом, где она обитает. Поскольку этот водоем находится на территории города, в него поступают неочищенные поверхностные стоки. Выращивание A. fusiformis в культуре позволит избежать предполагаемых негативных последствий и поставить более точные эксперименты.

Литература:

1. Баженова О.П., Коновалова О.А. и др. Элементный состав, кормовая ценность и запасы фитомассы артроспиры (Cyanoprokaryota) в озере Соленом (г. Омск) // Эколого-экономическая эффективность природопользования на современном этапе развития Западно-Сибирского региона. – Омск. 2012. – С. 186–190.

УДК 619:615:576

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF ARTHROSPIRA FUSIFORMIS (CYANOPROKARYOTE) FOUND IN LAKE SOLENOYE IN OMSK REGION

Vodolaga V.S., Boyko T.V., Bazhenova O.P., Konovalova O.A.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Omsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin», Omsk, Russia
644074, Institutskaya square, 1, Omsk
e-mail: valya.vodolaga-94@mail.ru

When studying Lake Solenoye located on the territory of Omsk, the extensive colonies of cyanobacterium Arthrospira fusiformis (arthrospira, spirulina) have been found that enables a great opportunity of using them as a source of food materials of high biological value.

Key words: arthrospira, spirulina, bioresource, toxicity.

When studying phytoplankton in water bodies located in the city of Omsk, in Lake Solenoye cyanobacterium Arthrospira fusiformis (Woronich.) Komárek et Lund (= Spirulina fusiformis Woronich.) which causes water bloom in the warmer time of the year was found. Intensive growth of arthrospira enables the use of Lake Solenoye as a source of valuable biological materials.

The analysis of the crude arthrospira biomass harvested in 2010-2011 showed its high feeding value: weight percentage of protein was 32,8-46,06%; phosphorus - 0,4-0,48%; calcium - 0,24-0,64%; ash - 28,4-45,4%; fibre - 21,0-38,7%; fat - 0,91-0,97. The ash of a biomass was rich in MgO - 16,3% by weight; CaO - 7,81 wt%, and Fe2O3 - 2,23wt%. By the content of designed food toxicants arthrospira phytomass from Lake Solenoye meets completely the requirements [1].

In August 2016 the Salt Lake arthrospira phytomass was selected to conduct toxicological experiments in animals. Frozen arthrospira phytomass was being fed to rats at a dose of 1.0 and 2.0 g / kg body weight daily for two weeks. Animals were actively eating arthrospira being active during the whole observation period, gastrointestinal changes weren't revealed. When analyzing the body weight dynamics in experimental groups of rats, an increase of 2% and 5% respectively was recorded.

Hematological analysis revealed lack of evident changes in blood parameters. In some animals a decrease in hemoglobin and erythrocytes concentration was recorded that indicates the development of hypoplastic anemia. In analyzing the parameters of venous leukocyte response in the control and experimental animals no evident changes comparing to background and target values were found. Absolute and relative abundance of lymphocytes, neutrophils, monocytes, and eosinophils in rats of both experimental groups remained at the control level.

A similar regularity was observed in the analysis of platelet indicators: the absolute number of platelets in the control rats was 831.5 × 109 / L, in the rats of the first experimental group - 823,2 × 109 / L, in the rats of the second experimental group - 821,8 × 109 / l. There was no difference in myeloperoxidase activity in granulocytes of experimental groups.

The development of hypoplastic anemia in animals of experimental groups is supposed to have resulted from the accumulation of metals in the body, which could be due to using crude arthrospira phytomass directly drawn from Lake Solenoye, its natural habitat. As that waterbody is located in the city so untreated waste waters flow into it. Growing A. fusiformis in culture allows the alleged adverse effects to be avoided that provide more precise results.

References:

1. *Bazhenova O.P., Konovalova O.A. and coll. Elemental composition, feeding value and stocks of arthrospira phytomass (Cyanoprokaryote) in Lake Solenoye (Omsk) // Ecological and economic efficacy of nature at the present stage of development of the West Siberian region.– Omsk, 2012. – pp. 186–190.*

УДК 54:615:57

РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИМИДАКЛОПРИД И ТИАКЛОПРИДСОДЕРЖАЩИХ НЕОНИКОТИНОИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Гонохова М.Н., Бойко Т.В., Герунова Л.К.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», Омск, Россия
644074, Омск, Институтская площадь, 1
e-mail: mn.gonokhova@omgau.org

Разработаны хроматографические методы определения имидаклоприда и тиаклоприда в биологических объектах, обладающие высокой чувствительностью и избирательностью, позволяющие в короткий срок провести исследование.

Ключевые слова: имидаклоприд, тиаклоприд, биоматериал, хроматографические методы определения.

Неоникотиноиды (Нн) – современный класс инсектицидов, широко используемый в растениеводстве, ветеринарии и быту в системе ротации пестицидов. По химической структуре выделяют нитрозосодержащие (имидаклоприд, клотианидин, динотефуран) и цианосодержащие (тиаклоприд, ацетамиприд) соединения [1]. Имидаклоприд- и тиаклопридсодержащие препараты обладают отдаленным неблагоприятным действием и представляют потенциальную опасность для животных при нарушении регламентов применения [2,3]. Для работы ветеринарным лабораториям необходимы простые в исполнении и чувствительные методы определения Нн в органах и тканях животных.

Нами разработаны методы определения имидаклоприда и тиаклоприда в биологических объектах с использованием высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии. Навеска органов или тканей животных составляла от 50 до 200 мг, экстракцию проводили ацетоном, растворенный сухой остаток вносили в жидкостный хроматограф «Хромос-ЖХ 301» с детектором спетрофотометрическим UVV 104М, используя колонку Диасфер-110С- 6 (150×4) мм, с размером частиц сорбента 5 мкм, в качестве элюента использовали смесь ацетонитрил-вода в соотношении 30:70. Анализ метрологических характеристик методов определения имидаклоприда и тиаклоприда в биологических объектах показывает высокую чувствительность и избирательность за счет уменьшения навески пробы и точного подбора экстрагента – ацетона. Исключение этапов очистки и использование данной подвижной фазы позволяет сократить продолжительность проведения анализа в два раза [4,5].

Способы определения имидаклоприда и тиаклоприда в биологических объектах хроматографическими методами просты, экономичны в осуществлении и могут быть применены в лабораториях для осуществления прижизненной или посмертной диагностики токсикоза при случайных острых отравлениях животных.

Литература:

1. *Еремина О. Ю. Перспективы применения неоникотиноидов в сельском хозяйстве России и сопредельных стран // Агрохимия. – 2005. – № 6. – С. 87-93.*
2. *Бойко Т.В. Роль пестицидов в развитии иммунопатологии и отдаленных эффектов // Аллергология и иммунология. – 2008, Т.9. – № 3. – С. 368-369.*
3. *Бойко Т.В. Эмбриотоксическое и тератогенное действие неоникотиноида Калипсо® при экспериментальной интоксикации самок крыс // Новейшие достижения ветеринарной фармакологии : материалы науч.-практич.конф., посвящ. 90-летнему юбилею патриарха отечественной фармакологии Рабиновичу М.И. – Троицк, 2012. – С. 21-24.*
4. *Патент РФ № 2011146011/28(068876), 10.06.2013*
   Бойко Т.В., Герунова Л.К., Урусова Т.В. Способ определения имидаклоприда в биологических объектах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии // Патент РФ № 24684458.2011. Бюл. № 16.
5. *Патент РФ № 2012143258/15, 27.05.2014*
   Бойко Т. В., Герунова Л. К., Гонохова М. Н., Лукша Е. А., Урусова Т. В., Темерова Е. В., Гончаров Д. С., Погодин И. С. Способ определения тиаклоприда в биологических объектах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии // Патент РФ № 2517075.2012. Бюл. № 15.

UDC 54:615:57

DEVELOPMENT OF CHROMATOGRAPHIC METHODS OF DETECTING IMIDACLOPRIDIC AND THIACLOPRIDIC NEONICOTINOIDS IN BIOLOGICAL OBJECTS

Gonokhova M.N., Boyko T.V, .Gerunova L.K.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Omsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin", Omsk, Russia
644074, Institutskaya square, 1, Omsk
e-mail: mn.gonokhova@omgau.org

Chromatographic methods with high sensitive and selective capacity enabling a short-term investigation have been developed for detection imidacloprid as well as thiacloprid in biological objects.

Key words: imidacloprid, thiacloprid, biological material, chromatographic test methods

Neonicotinoids (Nn) are a modern class of insecticide, widely used in plant-growing, veterinary medicine and household in the pesticides rotation system. Chemically, neonicotinoids are divided into two groups – nitrosic compounds (imidacloprid, dinotefuran, clothianidin) and cyanic ones (acetamiprid, thiacloprid). [1]. Due to late adverse effects imidaklopridic and thiaclopridic disinsectants are of potential hazard to the animals in case of poor adherence to application procedure [2,3]. Veterinary laboratories require easy-to-use but sensitive methods for determining Nn in the organs and tissues of animals.

We have developed methods for the determination of imidacloprid and thiacloprid in biological objects with the use of high performance fluid and thin-layer chromatography. Test samples of organs or tissues ranging from 50 to 200 mg were extracted with acetone, then the dissolved dry residue was placed in liquid chromatograph "Chromos LC 301" with petrophotometric detector UVV 104M with the help of the Diasfer 110S--6 column (150 × 4 mm), particle size of sorbent 5 m, at that acetonitrile and water solution at the ratio 30:70 as the eluent.

The analysis of metrological properties of the methods for determining imidacloprid and thiacloprid in biological objects indicates high sensitivity and selectivity by reducing the sample probes along with acetone as the best selection of extraction fluid. Purification exception as well as the usage of the mobile phase provides to reduce the analysis duration twofold [4,5].

As chromatographic methods of detecting imidacloprid and thiacloprid in biological objects are relatively easy-to-use and cost-effective, they can be applied in laboratories for life-time or post-mortem diagnosis of toxicity at accident acute poisoning of animals.

References

1. *Eremina O.Y. Prospects for the use of neonicotinoids in agriculture of Russia and neighboring countries // Agrochemistry. – 2005. – № 6. – pp. 87-93.*
2. *Boyko T.V. The role of pesticides in the development of immunopathology and long-term effects // Allergology and Immunology. – 2008, V.9. – № 3. – pp. 368-369.*
3. *Boyko T.V. Embryotoxic and teratogenic effects of neonicotinoid Kalipso® in female rats experimental intoxication // The latest achievements of veterinary pharmacology: conference proceedings, Troitzk, 2012. – pp. 21-24.*
4. *RF Patent № 2011146011/28(068876), 10.06.2013.*
   Boyko T.V., Gerunova L.K, Urussova T.V. A method for determining imidacloprid in biological objects using high performance fluid chromatography. // RF Patent № 24684458.2011. Vol.№ 16.
5. *RF Patent № 2012143258/15, 27.05.2014.*
   Boyko T.V., Gerunova L.K,Gonokhova M.N.,Luksha E.A., Urussova T.V., Temerova E.V., Goncharov D.S., Pogodin I.S. A method of determining thiacloprid in biological objects using high performance liquid chromatography // RF Patent № 2517075.2012. Vol. № 15.

УДК 547.8, 615.28, 579.61

ПРОИЗВОДНЫЕ ТРИС (1-АЛКИЛИНДОЛ-3-ИЛ) МЕТАНА, АКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ.

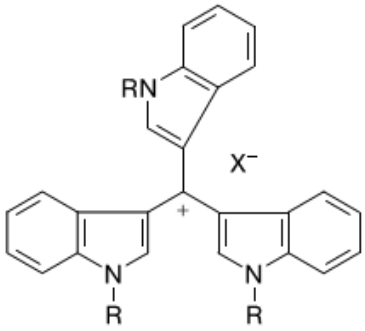
Тренин А.С., Лавренов С.Н., Мирчинк Е.П., Исакова Е.Б., Бычкова О.П., Симонов А.Ю., Лакатош С.А., Максимова М.А, Цвигун Е.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе» (ФГБНУ "НИИНА"), Москва, Россия
119021 г. Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБНУ "НИИНА"
e-mail: as-trenin@mail.ru.

Соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия - производные трис(1-алкилиндол-3-ил)метана, получаемые в НИИНА химическим синтезом, проявили высокую активность в отношении резистентных к антибиотикам бактериальных штаммов, включая клинические изоляты с множественной лекарственной устойчивостью.

Ключевые слова: антибиотики, производные трис(1-алкилиндол-3-ил)метана, антимикробная активность in vitro, множественная лекарственная устойчивость.

В связи с необходимостью разработки новых лекарственных препаратов, эффективных в отношении резистентных возбудителей, в том числе возбудителей, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (MDR), особое внимание исследователей обращено к новым классам химических соединений.



X- = Cl-

R = алкил (C4 - C5) (производные)

В НИИНА им. Г.Ф. Гаузе путем химического синтеза получены соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия - производные трис(1-алкилиндол-3-ил)метана, обладающие выраженной антимикробной активностью [1, 2]. Активность этих соединений была изучена в отношении широкого круга грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая коллекционные штаммы и клинические изоляты, устойчивые как к отдельным антибиотикам, так и обладающие MDR. Соединения с четырьмя – пятью атомами углерода в алкильных радикалах проявили в отношении бактерий и грибов наибольшую активность.

По своей активности in vitro в отношении грамположительных бактерий эти производные не уступали левофлоксацину. Их МПК в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, чувствительного ко всем антибиотикам, составила 0.13-0,25 мкг/мл и была такой же в отношении резистентных штаммов, в т. ч. *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) и резистентного к гентамицину клинического изолята *Staphylococcus epidermidis* 533. Соединения были активны в отношении *S. haemoliticus* 602 (MDR) и *S. aureus* 3798 (MRSA с промежуточной устойчивостью к гликопептидам (GISA)). По своей активности в отношении энтерококков *Enterococcus faecalis* 560 (MDR) и *E. faecium* 569 (MDR) они не уступали левофлоксацину (МПК 0,25-2,0 мкг/мл), были чрезвычайно активны в отношении устойчивых к левофлоксацину *S. aureus* ATCC 700699 (MDR) и *S. aureus* 3798.

В отношении грамотрицательных штаммов с MDR: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella cholerasuis* ATCC 14028 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 производные трис(1-алкилиндол-3-ил)метана демонстрировали умеренную активность (МПК 4,0 - 16,0 мкг/мл).

Таким образом, соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия проявили чрезвычайно высокую активность в отношении грамположительных бактерий, как чувствительных, так и устойчивых к антибиотикам, включая клинические изоляты MDR. По-видимому, соединения группы трис(1-алкилиндол-3-ил)метана, весьма перспективны для создания лекарственных препаратов, эффективных в отношении возбудителей с мно-

жественной лекарственной устойчивостью.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10300)

Литература:
1. Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E. et al. Synthesis and cytotoxic potency of novel tris(1-alkylindol-3-yl) methylium salts: role of N-alkyl substituents. //Bioorg. Med. Chem. 2010. V.18. N.18. P. 6905-6913.
2. Степанова Е.В., Штиль А.А., Лавренов С.Н. и др. Соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия – новый класс противоопухолевых соединений // Известия Академии наук. Серия химическая. 2010. Т.59. №12. С. 2203-2211.

.....

UDC 547.8, 615.28, 579.61

TRIS(1-ALKYLINDOL-3-YL)METHAN DERIVATIVES ACTIVE AGAINST MULTIDRUG RESISTANT PATHOGENS.

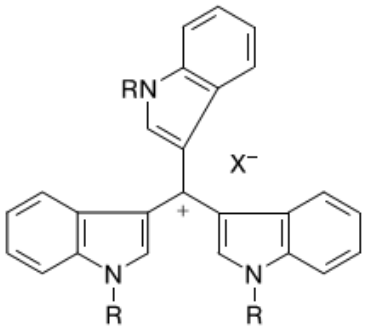
Trenin A.S., Lavrenov S.N., Mirchink E.P., Isakova E.B., Bychkova O.P., Simonov A.Y., Lakatosh S.A., Maximova M.A., Tsvigun E.A.

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia (GINA).
11, B. Pirogovskaya Street, Moscow, 119021, Russian Federation
e-mail: as-trenin@mail.ru

Tris(1-alkylindol-3-yl)methylium salts, which are tris(1-alkylindol-3-yl)methan derivatives that were obtained in GINA through chemical synthesis, demonstrated extremely high activity against bacterial strains resistant to antibiotics, including multidrug-resistant clinical isolates.

Key words: antibiotics, tris(1-alkylindol-3-yl)methan derivatives, antimicrobial activity in vitro, multidrug resistance.

Due to necessity of development of new medicines, that are active against drug-resistant and multidrug-resistant (MDR) pathogens, special attention is drawn to new classes of chemical compounds.



X- = Cl-

R = alkyl (C4 – C5) (derivatives)

Tris(1-alkylindol-3-yl)methylium salts with high antimicrobial activity, which are tris(1-alkylindol-3-yl)methan derivatives, were obtained in GINA through chemical synthesis [1, 2]. Their activity was tested against wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, including collection strains and clinical isolates, resistant to individual antibiotics or possessing MDR. Compounds with four - five carbon atoms in their alkyl radicals were most active against bacterial and fungal strains.

In vitro activity of the best derivatives against Gram-positive bacteria was almost as good as activity of fluoroquinolone levofloxacin, taken for comparison. Their MICs against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (strain, sensitive to all antibiotics) were 0.13-0,25 μg/ml and were as good as their MICs to resistant strains: *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA-strain), or clinical isolate *Staphylococcus epidermidis* 533, resistant to gentamicin. They were active against clinical isolate *Staphylococcus haemoliticus* 602 with MDR, or *S. aureus* 3798 (MRSA, with intermediate resistance to glycopeptides (GISA)). In their activity against multidrug-resistant isolates *Enterococcus faecalis* 560 and *Enterococcus faecium* 569 they were not inferior to levofloxacin (MIC 0,25-2,0 μg/ml) and were still active against resistant to fluoroquinolones strain *S. aureus* ATCC 700699 (MDR) and GISA-isolate *S. aureus* 3798.

Tris(1-alkylindol-3-yl)methan derivatives demonstrated moderate activity (MIC 4,0-16,0 μg/ml) against Gram-negative MDR-strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella cholerasuis* ATCC 14028 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Thus, tris(1-alkylindol-3-yl)methylium salts demonstrated extremely high activity against Gram-positive bacteria, sensitive or resistant to antibiotics, including MDR clinical isolates. The compounds of tris(1-alkyl indoles-3-yl) methane group seem to be perspective for the development of new drugs active against MDR pathogens.

The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (project №16-15-10300)

References:
1. *Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E. et al. Synthesis and cytotoxic potency of novel tris(1-alkylindol-3-yl) methylium salts: role of N-alkyl substituents. //Bioorg. Med. Chem. 2010. V.18. N.18. P. 6905-6913.*
2. *Stepanova E.V., Shtil' A.A., Lavrenov S.N., et al. Tris(1-alkylindol-3-yl)methylium salts as a novel class of antitumor agents. // Russian Chemical Bulletin. 2010. V. 59. N. 12. P. 2259-2267.*

.....

УДК 547.8, 615.28, 579.6

ПРОИЗВОДНЫЕ 3-(ИНДОЛ-1-ИЛ)-, 3-(N-АМИНОАРИЛ)- И 3-(S-ТИОАРИЛ) МАЛЕИМИДА С БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Тренин А.С., Лакатош С.А., Симонов А.Ю., Лавренов С.Н., Бычкова О.П., Копылова Т.М., Цвигун Е.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе» (ФГБНУ "НИИНА"), Москва, Россия
119021 г. Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБНУ "НИИНА";
e-mail: as-trenin@mail.ru.

Новые соединения в ряду 3,4-дизамещённых производных малеимида, полученные путем полного химического синтеза, обладают выраженной антимикробной активностью.

Ключевые слова: малеимиды, индолилмалеимиды, тиоарилмалеимиды, производные трииндолилметана, антимикробная активность in vitro, Halobacterium salinarum, отбор противоопухолевых соединений.

В ФГБНУ "НИИНА" им. Г.Ф.Гаузе путем полного химического синтеза получено свыше 20 новых химических соединений в ряду 3,4-дизамещённых производных малеимида. Отдельные соединения обладают выраженной антимикробной активностью in vitro в отношении грамположительных бактерий и грибов *Aspergillus niger.* Наибольшая антимикробная активность выявлена у 3-бромо-4-тиоарильных и 3,4-бистиоарильных производных, относящихся к новому классу химических соединений (рис.1).

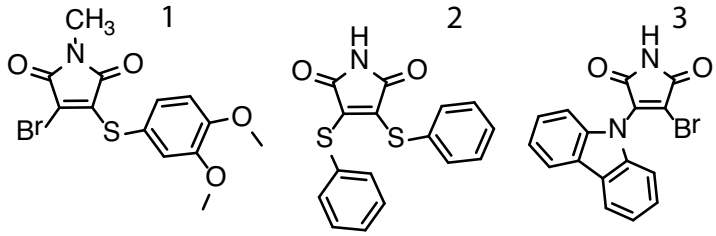


Рис.1. *Соединения 1, 2, 3 - производные малеимида, обладающие антимикробной активностью.*

В отношении грамположительных бактерий Staphylococcus aureus одним из наиболее активных оказалось 3-бромо-4-тиоарильное производное (соединение 1) (МПК 2 мкМ), лишь незначительно уступавшее взятым для сравнения производным трисиндолилметилия и фторхинолону левофлоксацину (МПК 1 мкМ). В отношении грибов A. niger соединение 1 также проявило высокую активность (МПК 3 мкМ). Соединения 2 и 3 в отношении грамположительных бактерий S. aureus и грибов A. niger проявили умеренную активность (МПК 8-12 мкМ).

Все соединения оказались неактивны в отношении грамотрицательных бактерий Escherichia coli, что говорит о специфическом характере их антимикробного действия.

Отдельные производные проявили себя в тест-системе с бактериальной культурой Halobacterium salinarum, используемой для отбора противоопухолевых антибиотиков [1, 2], что позволяет предполагать наличие у них потенциальных противоопухолевых свойств.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности создания в ряду производных 3-(индол-1-ил)-, 3-(N-аминоарил)- и 3-(S-тиоарил)малеимида соединений, обладающих антибакте-

риальной, антифунгальной и, возможно, противоопухолевой активностью.

Антибактериальная и антифунгальная активность у тиофенильных производных малеимида была обнаружена впервые.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10300).

Литература:

1. *Тренин А.С. Микробная модель Halobacterium salinarum для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. // Антибиотики и химиотерапия 2013. Т.58. № 5-6. С.3-10.*
2. *Тренин А.С., Цвигун Е.А., Бычкова О.П., Лавренов С.Н. Микробная модель Halobacterium salinarum в отборе синтетических аналогов антибиотика турбомицина А, обладающих противоопухолевым действием. // Антибиотики и химиотерапия 2013. Т.58. № 9-10. С.3-7.*

.....

UDC 547.8, 615.28, 579.6

3-(INDOL-1-YL)-, 3-(N-AMINOARYL)- AND 3-(S-THIOARYL)MALEIMIDE DERIVATIVES WITH BIOLOGICAL ACTIVITY.

Trenin A.S., Lakatosh S.A., Simonov A.Y., Lavrenov S.N., Bychkova O.P., Kopylova T.M., Tsvigun E.A.

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia (GINA).
11, B. Pirogovskaya Street, Moscow, 119021, Russian Federation
e-mail: as-trenin@mail.ru

Novel compounds among 3,4-disubstituted maleimide derivatives, that were obtained through total chemical synthesis, demonstrated pronounced antimicrobial activity.

Key words: maleimides, indolylmaleimides, thioarylmaleimides, trisindolylmethan derivatives, antimicrobial activity in vitro, *Halobacterium salinarum,* screening of antitumor compounds.

More than 20 novel compounds among 3,4-disubstituted maleimide derivatives were obtained in GINA through total chemical synthesis. Some of them possess a pronounced antimicrobial activity in vitro against Gram-positive bacteria and fungi *Aspergillus niger*. Novel 3-bromo-4-thioaryl and 3,4-bisthioaryl maleimides (Fig.1) that are the new class of chemical substances revealed the highest antimicrobial activity.

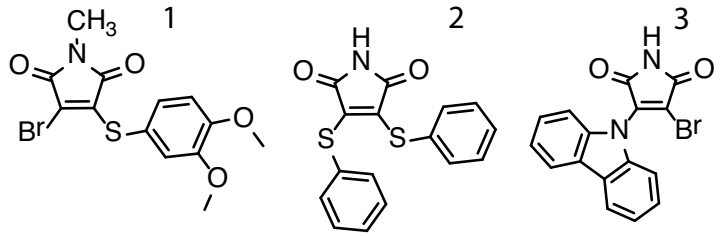


Fig.1. *Maleimide derivatives (compounds 1, 2, 3) possessing antimicrobial activity.*

3-Bromo-4-thioaryl derivative (compound **1**) turned out to be one of the most active against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (MIC 2 μM). It was only slightly inferior to trisindolylmethan derivatives and fluoroquinolone levofloxacin (MIC 1 μM), taken to compare. Compound **1** was also active against fungi *A. niger* (MIC 3 μM). Against Gram-positive bacteria *S. aureus* and fungi *A. niger* compounds **2** and **3** revealed moderate activity (MIC 8-12 μM).

All compounds were inactive against Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, indicating the specific character of their antimicrobial action.

Several derivatives appeared to be active in *Halobacterium salinarum* test-system that is used for selecting of antitumor antibiotics [1, 2]. This data allows to assume that such derivatives seem to have potential anticancer properties.

Thus, these results suggest the ability of the development on the basis of 3-(indol-1-yl)-, 3-(N-aminoaryl)- and 3-(S-thioaryl) maleimide derivatives new drugs with antibacterial, antifungal and possibly antitumor activity.

Antibacterial and antifungal activities of thiophenyl maleimide derivatives were detected for the first time.

The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (project №16-15-10300).

References.
1. *Trenin A.S. Microbial model of Halobacterium salinarum for screening inhibitors of sterol biosynthesis. //Antibiot. Khimioter. 2013. V.58. N.5-6. P.3-10. (article in Russian)*
2. *Trenin A.S., Bychkova O.P., Tsvigun E.A., Lavrenov S.N. Microbial model Halobacterium salinarum in screening of synthetic analogues of antibiotic turbomycin A with anticancer activity. //Antibiot. Khimioter. 2013. V.58. N.9-10. P.3-7. (article in Russian).*

УДК 577.18, 579.66, 615.33

ОБРАЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА СТЕРОЛОВ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ – ПРОДУЦЕНТАМИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Краснопольская Л.М., Тренин А.С., Кац Н.Ю., Зиангирова М.Ю., Максимова М.А, Бычкова О.П., Цвигун Е.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе» (ФГБНУ "НИИНА"), Москва, Россия
119021 г. Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБНУ "НИИНА"
e-mail: lmkrasnopolska@gmail.com

Штаммы базидиальных грибов *Ganoderma lucidum, Flammulina velutipes, Lentinus edodes, Pleurotus ostreatus*, ранее показавшие способность к синтезу полисахаридов с противоопухолевой активностью, образуют ингибиторы ранних и поздних этапов биосинтеза стеролов.

Ключевые слова*:* базидиомицеты, *Ganoderma lucidum, Flammulina velutipes, Lentinus edodes, Pleurotus ostreatus*, *Halobacterium salinarum,* погруженное культивирование, противоопухолевые полисахариды, ингибиторы биосинтеза стеролов.

Лекарственные базидиальные грибы известны своей способностью к синтезу полисахаридов, обладающих иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью [1].

Одним из возможных путей снижения себестоимости биологически активных полисахаридов является получение с помощью погруженной культуры дополнительных целевых продуктов. Учитывая практическую значимость обладающих гиполипидемическим действием ингибиторов биосинтеза стеролов (ИБС) [2, 3], целью настоящей работы явилось изучение способности ранее отобранных культур базидиальных грибов - продуцентов противоопухолевых полисахаридов к одновременному образованию ИБС.

Объектами исследования служили штаммы базидиальных грибов коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений НИИНА им. Г.Ф.Гаузе, относящиеся к видам *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer и *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. Ранее было показано, что полисахариды, выделенные из мицелия этих штаммов, проявляют выраженную противоопухолевую активность в экспериментах in vivo в отношении перевиваемых мышиных опухолей [4, 5].

Длительность оптимизированных процессов периодического погруженного культивирования базидиомицетов, позволяющего строго контролировать условия выращивания мицелия указанных штаммов и, таким образом, обеспечивать стабильность состава образуемых ими метаболитов, составила 3-5 суток. Условия культивирования указанных штаммов базидиомицетов позволили обеспечить максимальный выход биомассы. Выход водорастворимых полисахаридов достигал 7-8 г/л.

Изучение указанных штаммов в *модельной системе Halobacterium salinarum, разработанной для скрининга ИБС и противоопухолевых антибиотиков* [6], показало наличие у них способности *к одновременному образованию ИБС, подавляющих как ранние, так и поздние (после образования мевалоната) этапы биосинтеза стеролов. О*тобраны штаммы, наиболее перспективные для дальнейшего использования.

Литература:
1. *Автономова А.В., Краснопольская Л.М. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства трутовика лакированного (Ganoderma lucidum) //Микология и фитопатология, 2013. Т. 47. № 1. С. 3-11.*

2. *Тренин А.С. Микробные метаболиты - ингибиторы биосинтеза стеролов, их химическое разнообразие и особенности механизма действия. //Биоорганическая химия. 2013. Т.39. №6. С.633-657.*
3. *Тренин А.С. Вторичные метаболиты грибов - ингибиторы биосинтеза стеролов. //Прикладная биохимия и микробиология. 1998. Т.34. №2. С.131-138.*
4. *Шуктуева М.И., Ярина М.С., Автономова А.В., Исакова Е.Б., Бухман В.М., Краснопольская Л.М. Система скрининга водорастворимых полисахаридов базидиальных грибов с противоопухолевыми свойствами. // Успехи медицинской микологии. 2014. Т. 12. С. 342-344.*
5. *Краснопольская Л.М., Ярина М.С., Автономова А.В. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности полисахаридов из мицелия Ganoderma lucidum в опытах in vivo // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60. № 11-12. С. 29-34.*
6. *Тренин А.С., Цвигун Е.А., Бычкова О.П., Лавренов С.Н. Микробная модель Halobacterium salinarum в отборе синтетических аналогов антибиотика турбомицина А, обладающих противоопухолевым действием. // Антибиотики и химиотерапия 2013. Т.58. № 9-10. С.3-7.*

UDC 577.18, 579.66, 615.33

PRODUCTION OF INHIBITORS OF STEROL BIOSYNTHESIS BY BASIDIOMYCETES THAT FORM ANTITUMOR POLYSACCHARIDES

Krasnopolskaya L.M., Trenin A.S., Kats N.Yu., Ziangirova M.Yu., Maximova M.A., Bychkova O.P., Tsvigun E.A.

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia (GINA).
11, B. Pirogovskaya Street, Moscow, 119021, Russian Federation
e-mail: lmkrasnopolska@gmail.com

Strains of basidiomycetes *Ganoderma lucidum, Flammulina velutipes, Lentinus edodes, Pleurotus ostreatus* that demonstrated earlier their ability to form antitumor polysaccharides can produce inhibitors of early and late stages of sterol biosynthesis.

Key words: Basidiomycetes, Ganoderma lucidum, Flammulina velutipes, Lentinus edodes, Pleurotus ostreatus, Halobacterium salinarum, submerged cultivation, antitumor polysaccharides, inhibitors of sterol biosynthesis.

Medicinal basidiomycetes are mainly known for their ability to synthesize polysaccharides with immunomodulating and antitumor activity [1].

One of the ways to reduce the cost of biologically active polysaccharides is to provide submerged cultivated Basidiomycetes to produce additional target products. Taking into account the practical importance of inhibitors of sterol biosynthesis (ISB) [2,3], possessing in particular lipid-lowering effect, the goal of the study was investigation of Basidiomycetes that had been previously selected as antitumor polysaccharides producers for their ability for simultaneous ISB production.

The objects of study were the basidiomycetes strains of the collection of GINA Laboratory of biosynthesis of bioactive compounds. The strains belonged to the species: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. Previously it was shown that the polysaccharides that were isolated from mycelium of these strains exhibit pronounced antitumor activity in vivo against transplanted mouse tumors [4, 5].

The duration of optimized processes of periodically submerged cultivation of basidiomycetes, which makes possible the strict control of cultivation conditions for mycelium growth and, thus, ensure the stability of metabolites composition, amounted to 3-5 days. Cultivation conditions allowed the maximum yield of biomass. Yield of water-soluble polysaccharides reached 7 - 8 g/l.

The study of these strains in the model system of *Halobacterium salinarum*, which was designed for screening of ISB and antitumor antibiotics [6-8], showed the ability of basidiomycetes strains for simultaneous formation of ISB, inhibiting either early (before mevalonate formation) or late stages of sterol biosynthesis. There were strains most promising for further usage selected.

References:

1. *Avtonomova A.V., Krasnopolskaya L.M. Anti-tumor and immunomodulatory activities of Ganoderma lucidum // Mikol. Fitopatol., 2013. V. 47. N 1. P. 3-11. (article in Russian).*
2. *Trenin A.S. Microbial metabolites inhibiting sterol biosynthesis: Their chemical diversity and characteristics of the mechanism of action. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2013, V.39. N. 6. P. 565–587.*

3. *Trenin A.S. Fungal secondary metabolites that inhibit sterol biosynthesis (Review). //Applied Biochemistry and Microbiology. 1998. V.34. N. 2. P.117-123.*
4. *Shuktueva M.I., Yarina M.S., Avtonomova A.V., Isakova E.B., Bukchman V.M., Krasnopolskaya L.M. Water-soluble polysaccharides with antitumor properties basidiomycetes: screening system // Uspekhi Med. Mikol., 2014. V. 12. P. 342-344. (article in Russian).*
5. *Krasnopolskaya L.M., Yarina M.S., Avtonomova A.V.1, Usov A.I., Isakova E.B., Bukchman V.M. Antitumor activity of polysaccharides from Ganoderma lucidum mycelium: in vivo comparative study // Antibiot. Khimioter., 2015. V. 60. N 11-12. P.29-34. (article in Russian).*
6. *Trenin A.S., Bychkova O.P., Tsvigun E.A., Lavrenov S.N. Microbial model Halobacterium salinarum in screening of synthetic analogues of antibiotic turbomycin A with anticancer activity. //Antibiot. Khimioter. 2013. V.58. N.9-10. P.3-7. (article in Russian).*
7. *Trenin A.S. Microbial model of Halobacterium salinarum for screening inhibitors of sterol biosynthesis. //Antibiot. Khimioter. 2013. V.58. N.5-6. P.3-10. (article in Russian).*
8. *Terekhova L.P., Galatenko O.A., Trenin A.S., et al. Isolation and study of antibiotic INA-1132 (chlorothricin), produced by actinomycete strain Streptomyces baarnensis. //Antibiot. Khimioter. 2008. V.53. N.7-8. P.3-7. (article in Russian).*

УДК 58.085

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫХОДА ГЛИКОЗИДОВ ИЗ БИОМАССЫ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ DIGITALIS PURPUREA L.

Смольникова Я. В.[1], Величко Н. А.[1], Тарнопольская В. В.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Красноярский аграрный университет», Красноярск, Россия
660130, г. Красноярск, ул. Стасовой 42
e-mail: ya104@yandex.ru
[2] ФГБОУ ВО «Сибирский государственный аэрокосмический университет имени академика М.Ф. Решетнева», Красноярск, Россия

Проведено математическое моделирование и определены оптимальные параметры извлечения гликозидов из каллусной ткани Digitalis purpurea L. Для обеспечения максимального выхода гликозидов из каллусной ткани Digitalis purpurea L. экстракцию необходимо проводить при следующих параметрах: продолжительность экстракции 12 ч, гидромодуль 10, размер частиц 3 мм.

Ключевые слова: экстракция, сердечные гликозиды, каллусная ткань, Digitalis purpurea L.

Наперстянка пурпурная (Digitalis purpurea L.) служит природным источником стероидных соединений карденолидов, которые широко применяются в современной фармакотерапии и не имеют синтетических аналогов. Основными продуктами переработки Digitalis purpurea L., представляющими промышленный интерес, являются препараты сердечных гликозидов (суммарные или индивидуальные). Перспективным представляется создание технологии, при которой осуществлялось бы круглогодичное, независимое от внешних факторов, культивирование клеточной биомассы растения и получение гликозидов на его основе.

Целью данного исследования являлось математическое моделирование и подбор оптимальных условий выделения гликозидов из каллусной ткани Digitalis puprurea L.

Объектом исследования являлась каллусная ткань, полученная из листовых пластин интактных растений Digitalis puprurea L. Культивирование каллусной ткани проводили на среде с минеральной основой по Мурасиге и Скугу с добавлением гормонов: ИУК (индолилуксусной кислоты) в концентрации 0,1 мг/л и 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты) в концентрации 0,1 мг/л.

Для проведения математического моделирования использовали программный пакет Maple.

Факторами, влияющими на полноту извлечения гликозидов были выбраны: x1 – продолжительность экстракции; x2 – гидромодуль; x3 – размер частиц сырья. Функция отклика - выход сердечных гликозидов y, % от а. с. м.

Влияние на выход гликозидов f1, % от а. с. м., продолжительности экстракции, гидромодуля и размера частиц представлено следующей функциональной зависимостью:

$$f_1(x_1, x_2, x_3) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_1x_2 + b_5x_1x_3 + b_6x_1x_2x_3 + \varepsilon(x_1, x_2, x_3)$$

где b0=0,3270185185; b1=0,006897966594; b2=–0,0006851851854; b3=0,008666666663; b4=0,0002301379811; b5=0,00776906318; b6=6,44880174 – вычисленные по методу наименьших квадратов коэффициенты регрессии.

Выход гликозидов увеличивается при уменьшении гидромодуля, увеличении продолжительности экстракции и размера частиц.

Максимальный выход гликозидов из каллусной ткани Digitalis purpurea L. составил 0,68 % а. с. м., при следующих параметрах: продолжительность экстракции 12 ч, гидромодуль 10, размер частиц 3 мм.

Литература:
1. *In vitro propagation and cardiac glycosides content of Digitalis lanatas / A. M. Ghanem, A. M. Aboul–Enein, A. El-Sawy, M. R. Rady, M. Mona // Ibrahem international journal of academic research. 2010. V. 2. No. 6. November, Part II. P. 349–356.*
2. *Hagimori M., Matsumoto T., Mikami Y. Fermenter culture of shoot–forming cultures of Digitalis purpurea L. // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48 (4). P. 965–970.*
3. *Mulabal V., Tsay H. S. Plant Cell Cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites // International Journal of Applied Science and Engineering. 2004. V. 2. P. 29–48.*
4. *Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in Digitalis lanata Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates / F. Zohra, M. Abdul, F. Samar, A. Anjum, U. Shahid // Cellular Differentiation and Molecular Genetics Section, Department of Botany, Turk J Bot. 2009. V. 33. P. 393–405.*

UDC 58.085

OPTIMIZATION OF GLYCOSIDES' YIELD FROM DIGITALIS PURPUREA L. CALLUS TISSUE BIOMASS

Smolnikova Ya. V. 1, Velichko N. A. 1, Tarnopolskaya, V. V. 2

[1] Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Krasnoyarsk state agrarian university, Krasnoyarsk, Russia
660130, Krasnoyarsk, Stasova st. 42
e-mail: ya104@yandex.ru
[2] Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Reshetnev Siberian State Aerospace University, Krasnoyarsk, Russia

Mathematical modeling was performed and optimal values of parameters for extraction of glycosides from callus tissue of *Digitalis purpurea* L. were determined. The range of extraction parameters providing for maximum yield of glycosides from callus tissue of *Digitalis purpurea* L. includes: duration of extraction 12 hrs, hydromodule (liquid/solid ratio) 10:1, particle size 3 mm.

Key words: extraction, cardiac glycosides, callus tissue, *Digitalis purpurea* L.

Digitalis purpurea *(Digitalis purpurea* L.) is a natural source of steroid cardenolides, which are widely used in modern pharmacotherapy and have no synthetic counterparts. Both total or individual cardiac glycosides-based medications are the main products of industrial interest of *Digitalis purpurea* L. processing. Developing technology of year-round, independent of external factors cultivation of plant cell biomass and production of glycosides is considered rather prominent.

This study was focused on building a mathematical model and determining optimal values of parameters for extraction of glycosides' from callus tissue of *Digitalis puprurea* L.

The object of research was callus tissue obtained from leaf plates of intact *Digitalis puprurea* L. plants. Cultivation of callus tissue was carried out on Murashige and Skoog mineral-based medium with addition of the following hormones: 0.1 mg/l IAA (indoleacetic acid) and 0.1 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). The mathematical model was built using Maple software package.

The following factors affecting glycosides recovery rate were selected: x_1 – duration of extraction; x_2 – hydromodule; x_3 – the particle size of raw material. Response function y - the output of cardiac glycosides, % per dry weight.

The following functional relationship reflects influence of extraction duration, hydromodule and particle size

on yield of glycosides:

$$f_1(x_1, x_2, x_3) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_1x_2 + b_5x_1x_3 + b_6x_1x_2x_3 + \varepsilon(x_1, x_2, x_3)$$

where b0=0,3270185185; b1=0,006897966594; b2=-0,0006851851854; b3= 0,008666666663; b4=0,0002301379811; b5=0,00776906318; b6= 6,44880174 – regression coefficients calculated via least-square method.

The yield of glycosides increases with a decrease in hydromodule and simultaneous increase of both extraction duration and particle size.

The maximum dry matter yield of glycosides from callus tissue of *Digitalis purpurea* L. reached up to 0.68 % at the following values of extraction parameters: the duration of extraction 12 hrs, hydromodule (liquid/solid ratio) 10:1, particle size 3 mm.

References:

1. *In vitro propagation and cardiac glycosides content of Digitalis lanatas / A. M. Ghanem, A. M. Aboul–Enein, A. El-Sawy, M. R. Rady, M. Mona // Ibrahem international journal of academic research. 2010. V. 2. No. 6. November, Part II. P. 349–356.*
2. *Hagimori M., Matsumoto T., Mikami Y. Fermenter culture of shoot–forming cultures of Digitalis purpurea L. // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48 (4). P. 965–970.*
3. *Mulabal V., Tsay H. S. Plant Cell Cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites // International Journal of Applied Science and Engineering. 2004. V. 2. P. 29–48.*
4. *Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in Digitalis lanata Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates / F. Zohra, M. Abdul, F. Samar, A. Anjum, U. Shahid // Cellular Differentiation and Molecular Genetics Section, Department of Botany, Turk J Bot. 2009. V. 33. P. 393–405.*

.....

УДК 576.5

СЕЛЕН КАК РЕГУЛЯТОР РОСТА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *LYCHNIS CHALCEDONICA* L.

Видершпан А.Н., Бойко Е.В., Чигинцова А.Е., Головацкая И.Ф.

Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, 634050, пр. Ленина, 36
e-mail: van1303@mail.ru

Установлено, что введение селенита натрия в питательную среду ускорило ростовые процессы (размеры клеток, содержание сухого вещества) каллусной клеточной культуры *Lychnis chalcedonica* L.

Ключевые слова: *Lychnis chalcedonica* L.; клеточные культуры; селенит натрия; ростовой индекс; перекисное окисление липидов.

Растения часто являются незаменимыми источниками биологически активных веществ (БАВ). Однако с сокращением ресурсов некоторых ценных дикорастущих растений ограничивается возможность получения многих фармакологически значимых веществ в промышленном масштабе. Одним из путей решения проблем сохранения растительных ресурсов и получения БАВ является биотехнологический способ воспроизводства растений – культуры растительных клеток. Изменение физических и химических параметров среды оказывает существенное влияние на физиологические процессы в культуре растительных клеток. На сегодняшний день ограничены сведения о влиянии селена, как эссенциального элемента, на рост клеточных культур. Известно, что селен влияет на устойчивость растительного организма к различным стрессорным факторам, в том числе к УФ-радиации, гербицидам, гипотермии, старению и засолению (Блинохватов и др., 2001; Yao, 2010). В связи с этим целью наших исследований было изучение регуляции роста клеточной культуры *L. chalcedonica in vitro* селенитом натрия.

Объектом исследования служила полученная авторами клеточная культура лихниса хальцедонского (*L. chalcedonica*). Присутствие большого числа вторичных метаболитов послужило основой для введения этого вида в культуру *in vitro*. Культивирование клеточной культуры *L. chalcedonica*, полученной из листовых эксплантов, осуществляли в темноте на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением фитогормонов НУК (нафтилуксусная кислота) и 6-бензиламинопурина (контроль) и селенита

натрия (опыт). Селенит натрия («Sigma», США) добавляли в питательную среду в концентрации 1 нМ. В процессе 25-дневного культивирования определяли кривую роста каллуса, для этого через каждые 5 суток измеряли его сырую и сухую биомассу. На основе данных рассчитывали ростовой индекс. По окончании эксперимента была изучена морфология клеток и определена интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клеточной культуре, как показателя ее окислительно-восстановительного гомеостаза. В результате исследования было установлено, что активный рост контрольной культуры происходил первые 11 суток, затем тормозился и выходил на плато. Введение селенита натрия изменяло рост клеточной культуры *L. chalcedonica*. Он ускорял накопление сырой и сухой биомассы каллуса в первые 15 суток культивирования, постепенно снижая прирост. При выращивании опытной каллусной культуры отметили накопление сырой биомассы, сопровождающееся уменьшением общей оводненности, что могло свидетельствовать о накоплении сухой биомассы в результате активации клеточного деления или дифференцировки клеток. Положительное влияние селенита натрия на ростовые процессы каллусной культуры могло быть связано со снижением интенсивности ПОЛ, поскольку отмечена тенденция к снижению содержания малонового диальдегида – продукта ПОЛ. Введение селенита натрия в среду способствовало росту клеточной культуры, так, средняя длина клеток составила 30 (у мелких) и 107 мкм (у крупных клеток).

Таким образом, установлено, что введение селенита натрия в питательную среду ускорило ростовые процессы каллуса, в том числе увеличило размеры клеток и синтез сухого вещества каллуса.

Литература:
1. Блинохватов А.Ф., Вихрева В.А., Денисова Г.В. и др. Селен в биосфере. Пенза: РИО ПГСХА, 2001. 324 с.
2. Yao X.Q., Chu J.Z., Ba C.J. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B // Biol. Trace Elem. Res. 2010. Vol. 136. P. 96-105.

.....

UDC 576.5

SELENIUM AS A GROWTH REGULATOR OF CELL CULTURE *LYCHNIS CHALCEDONICA* L.

Vidershpan A.N., Boyko E.V., Chigintsova A.E., Golovatskaya I.F.

Tomsk National Research State University, Department of Plant Physiology and Biotechnology,
Russia, Tomsk, 634050, Lenin avenue, 36
e-mail: van1303@mail.ru

It was found that injection of sodium selenite into the nutrient medium speeded up growth processes (cells sizes, solids content) of callus cell culture *Lychnis chalcedonica* L.

Key words: *Lychnis chalcedonica* L.; cell cultures; sodium selenite; growth index; lipid peroxidation.

Plants are often unchangeable sources of biologically active substances (BAS). However, because of the resource reduction of some wild growing plants the opportunity of getting many pharmacologically important substances in the industrial scale restricts. One of the ways of solving problems in preservation of plant resources and BAS production is biotechnological method of plant reproduction – the culture of plant cell. Changing of physical and chemical parameters of the environment makes significant influence on the physiological processes in culture of plant cells. For today, the information about the impact of selenium, as the essential elements, on the growth of cell cultures is limited. Well known, that selenium affects the stability of the plant body to various stressors, including to the UV radiation, to herbicides, to hypothermia, to aging and exposed to salt accumulation in the soil (Blinohvatov et al., 2001; Yao, 2010). Thereby the aim of our researches was the study of cell culture growth regulation *L. chalcedonica in vitro* by sodium selenite.

The object of research was cell culture of *Lychnis chalcedonica* L., that was obtained by the authors. The presence of a large number of secondary metabolites was the main for introducing of this type in culture *in vitro*. Cultivation of cell culture *L. chalcedonica*, obtained from leaf explants, was performed in the dark on the modified nutrient medium Murashige-Skoog with addition phytohormones NAA (naphthyl acetic acid) and 6-benzyl aminopurin (check) and sodium selenite (experience). Sodium selenite («Sigma», USA) was added to the nutrient medium at a concentration of 1 nanomolar. In the course of 25 days cultivation was determined callus growth curve, for that in every 5 days was measured its crude and dry biomass. Based on the data calculated growth index. By the end of the experiment was studied cell morphology and was determined the intensity of peroxide oxidation of lipids (POL)

in cell culture, as an indicator of the redox homeostasis. The study found that active control culture growth was the first 11 days, then he paused and reached a plateau. The introduction of sodium selenite changed the growth of the cell culture *L. chalcedonica*. It accelerated accumulation of wet and dry biomass of callus in the first 15 days of cultivation, gradually reducing the growth. In growing experimental callus culture noted the accumulation of raw biomass, accompanied by the decrease in the total hydration, it could indicative of accumulation of dry biomass as a result of activation of cell division or cell differentiation. Positive influence of sodium selenite on the growth processes callus culture could be related with a reduction of POL, because there was a tendency to reduction of the content of malondialdehyde – the product of POL. The introduction of sodium selenite into the environment promoted the growth of the cell culture, thus, the average cells length was 30 (for small cells) и 107 μm (for large cells).

Thus, found that introduction of sodium selenite in the nutrient medium accelerated the growth processes of callus, as well as increased the size of cells and the synthesis of the dry matter of callus.

References:
1. Blinohvatov A.F., Vihreva V.A., Denisova G.V. and others. Selenium in the biosphere. Penza: EPD PSAA, 2001. 324 p.
2. Yao X.Q., Chu J.Z., Ba C.J. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B // Biol. Trace Elem. Res. 2010. Vol. 136. P. 96-105.

УДК 663.13

БИОРЕАКТОР ВЫТЕСНЕНИЯ С МЕМБРАННЫМ УСТРОЙСТВОМ СТЕРИЛИЗАЦИИ ГАЗОВОГО ПИТАНИЯ

Латыпов Э.Д., Шавалиев М.Ф., Мухачев С.Г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»), Казань, Россия
420088, Казань, ул. Пр. Победы, д. 224, кв. 83
e-mail: Marat_Shavaliev@mail.ru

Предложена конструкция биореактора вытеснения с мембранным устройством стерилизации газового питания и инверсией фаз газ-жидкость. Данная конструкция позволяет достигать большей производительности за счет увеличенной удельной поверхности раздела фаз.

Ключевые слова: мембрана, мембранный биореактор, массообмен, инокулят.

Ранее выполнены работы [1-4] по созданию биотехнологического комплекса участка чистой культуры спиртовых дрожжей - это разработка интенсивной аэробной технологии дрожжегенерации, решение которой рассмотрено с применением мембранного биореактора (инокулятора).

Одной из важных задач при культивировании микроорганизмов является обеспечение требований высокой асептики.

Было показано [5,6], что применение мембран растворимости снимает проблему асептического ведения процесса, однако при этом наблюдается низкая удельная интенсивность транспорта кислорода, что требует максимального увеличения удельной поверхности мембран.

Так как массообмен (сульфитное число) является одним из лимитирующих показателей во всех аппаратах, приведем массообменные характеристики уже разработанных конструкций:

- инокулятор с мембранным устройством подвода газового питания с осевым по отношению к мембранам движением жидкостного потока: удельная площадь поверхности - 155 $м^2/м^3$; Pmax - 0,25Мпа; 0,898 $гО_2$/л·ч [7];

- инокулятор со спиральным движением жидкостного потока перпендикулярно к оси мембран: удельная площадь поверхности - 155 $м^2/м^3$; Pmax - 0,31МПа; 1,2 $гО_2$/л·час [4].

В обоих этих конструкциях процесс массообмена организован таким образом, что газ под давлением подается во внутреннею полость мембран, а культуральная жидкость снаружи (омывает мембраны).

Предложена и разработана альтернативная конструкция с инверсией газовой и жидкой фазы: жидкость подается в полость мембран, газ подается во внешнюю полость аппарата, тем самым поток газового питания направлен с внешней стороны к центру мембраны. Предложенное изменение организации потоков позволяет существенно увеличить удельную поверхность раздела фаз и тем самым повысить массообменные характеристики биореактора.

Литература:
1. Емельянов В.М. Биотехнологический комплекс участка чистой культуры спиртовых дрожжей// Биотехнология состояние и перспективы развития: Матер. Междунар. конгресса. Москва, 2002. С. 96-98.
2. Александровская Ю. П. Аэробное культивирование спиртовых дрожжей в биореакторе с мембранным аэрирующим устройством [Текст] :дис. ... канд. техн. наук : 03.00.23 / Александровская Юлия Павловна. – Казань, 2004. – 173 с
3.Шавалиев М.Ф., Мухачев С.Г., Емельянов В.М. Оценка параметров процесса культивирования дрожжей в инокуляторе с мембранным устройством подвода газового питания// Вестник КНИТУ. – 2011. – № 5. –С. 150-153
4. Латыпов Э.Д., Шавалиев М.Ф., Мухачев С.Г Оценка массообменных характеристик инокулятора со спиральным движением потоков//Научная сессия: тезисы докл. – Казань,2013 – с 85
5. Мухачев С. Г. Аэробное выращивание посевной культуры сахаромицетов в биореакторе с мембранной стерилизацией кислорода / С. Г. Мухачев, В. М. Емельянов // Биотехнология. – 2005. – №3. – С. 71-78.
6. Латыпов Э.Д., М.Ф. Шавалиев Краткий обзор использования мембран и мембранных технологий//Вестник КНИТУ. – 2016. – Т.19 № 8. –С. 138-141
7. Шавалиев М. Ф. Лабораторный реактор вытеснения с мембранным устройством стерилизации кислорода // II Всероссийская студенческая научно – техническая конференция «Интенсификация тепло – массообменных процессов, промышленная безопасность и экология»: докл. – Казань: Бутлеровское наследие, 2007. – С. 45.

.....

UDK 663.13

PLUG FLOW BIOREACTOR THE MEMBRANE DEVICE STERILIZATION OF THE GAS SUPPLY

Latypov E.D., Shavaliev M.F., Muhachev S.G.

Federal state budgetary educational institution of the higher education «Kazan national research technological university» («KNITU»), Kazan, Russia
420088, Kazan, Pr. Popedy, 224/83
e-mail: Marat_Shavaliev@mail.ru

Is offered the bioreactor design with the membrane device of sterilization of a gas supply phase inversion gas-liquid. This design allows to reach larger efficiency at the expense of the increased specific surface area of phases.

Key words: membrane, membrane bioreactor, mass transfer, inoculums.

Earlier were performed works [1-4] on creation of a biotechnological complex of the site of pure growth of spirit yeast - it is development of intensive aerobic technology of a yeast cultivation which solution is considered with use of the membrane bioreactor (inoculums).

One of important tasks at cultivation of microorganisms is providing requirements of a high asepsis. Earlier [5-6] was shown that application of membranes of solubility removes a problem of aseptic conducting process, however is observed at the same time low specific intensity of transport of oxygen that demands the maximal increase in a specific surface area of membranes.

As the mass transfer (sulphitic number) is one of the main indexes in all devices, we will provide the main characteristics of designs:

- an inoculator with the membrane device of the gas supply with driving of a liquid stream of: specific surface area - 155 m^2/m^3, axial in relation to membranes, Pmax - 0,25 MPa, 0,898 gO_2/ l • h [7].

- an inoculator with spiral moving of a liquid stream perpendicularly to an axis of membranes of: specific surface area - 155 m^2/m^3, Pmax - 0,31 MPa, 1,2 gO_2/l • h [4].

In both of these designs process of a mass transfer is organized in such a way that gas is under pressure supplied in internal a cavity of membranes, and cultural liquid outside (washes membranes).

Is offered and developed the alternate design with inversion of a gas and liquid phase: liquid moves in a cavity of membranes, gas is supplied in an external cavity of the device, thereby the stream of a gas supply is directed from outer side to the center of a membrane.

The offered change of the organization of streams allows to increase significantly a specific surface area of phases and by that to increase mass transfer characteristics of the bioreactor.

References:
1. *Emelyanov V.M. Biotechnological complex plot of a pure culture of alcohol yeast// Biotechnology condition and development prospects: Mater. Intern. Congress. Moscow, 2002. p. 96 – 98.*
2. *Aleksandrovskaya Y.P. Aerobic culture of alcohol yeast in a bioreactor with the membranous aerating device [Text]: dis. ... Cand. tehn. sciences: 03.02.23/ Aleksandrovskaya Yuliya Pavlovna , 2004. – 173 p.*
3. *Shavaliev M.F, Muhachev S.G., Emelyanov V.M Parameter estimation of yeast cultivation process inoculator with membrane unit feed-gas// Herald journal KNITU. – 2011. – №5 – P. 150 – 153*
4. *Latypov E. D., Shavaliev M.F, Muhachev S.G Evaluation of mass transfer characteristics inoculator spiral movement flows // Scientific session: rept. – Kazan, 2013 – p.85*
5. *Muhachev S.G. Aerobic cultivation of Saccharomyces seed culture in a bioreactor with a membrane sterilization oxygen / S.G Muhachev , V.M Emelyanov // Biotechnology. – 2005. – №3. – P.71.– 78.*
6. *Latypov E. D., M.F. Shavaliev A brief overview of the use of membranes and membrane technology// Herald journal KNITU. – 2016. – T.19 №8. – P.138 – 141*
7. *Shavaliev M.F. Laboratory reactor displace oxygen from the membrane sterilization device // II All-Russian Student Scientific – Technical Conference «Intensification of heat – mass transfer processes, safety and the environment»: rept.- Kazan : Butlerov heritage 2007, P. 45*

УДК 57.063.8:663.13:578.245:577.112.5/.856

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *PICHIA PASTORIS*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ СВОБОДНУЮ И ХИМЕРНУЮ ФОРМЫ ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2В ЧЕЛОВЕКА

Пыхтина М.Б., Мамаев А.Л., Беклемишев А.Б.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно исследовательский институт биохимии», Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

В данной работе получены рекомбинантные штаммы дрожжей *Pichia pastoris*, эффективно продуцирующие зрелый интерферон альфа-2б *человека (ИФН) и его химерную форму в виде полипептида, слитого с аполипопротеином* A-I (апоA-I). *Обе формы ИФН секретировались в культуральную среду.*

Ключевые слова: синтетический ген, *клонирование, Pichia pastoris*, интерферон альфа-2б, *аполипопротеин A*-I, химерные полипептиды

Интерферон альфа-2б является широко используемым цитокином, применяемым для лечения множества вирусных заболеваний (вирусные гепатиты С и В, герпес- вирусные инфекции и др.), некоторые виды онкозаболеваний, иммунодефицитные состояния и т.д. Существенным ограничением в использовании ИФН для терапевтических целей является его короткий период полужизни в плазме крови и высокая токсичность. Для увеличения времени циркуляции ИФН в крови и снижения его токсичности используют две основные стратегии: «сшивают» ИФН с полиэтиленгликолем (пегилирование) [1], либо получают его комплексы в виде химерных полипептидов с белками плазмы крови, [2, 3]. J. Fioravanti и др. с помощью экспрессии в клетках *E. coli* получили химер ИФН с апоA-I, который обеспечивал увеличение периода полужизни комплекса за счет инкорпорации в циркулирующие ЛПВП, адресную доставку ИФН в ткани и органы, содержащие рецепторы к апоA-I и существенное снижение токсичности цитокина [3].

Получение рекомбинантных белков в системе экспрессии *P. pastoris* имеет ряд преимуществ (высокий выход целевых белков, секретируемых в культуральную жидкость, посттрансляционные модификации белков, сходные с таковыми у человека и др.). В связи с этим, целью настоящей работы было получение штаммов *P. pastoris,* эффективно продуцирующих две формы секретируемого рекомбинантного ИФН - как свободную, так и в виде химера с апоA-I человека. Предполагается в дальнейшей работе провести сравнение иммунологических и токсических свойств этих двух форм ИФН.

Нуклеотидные последовательности гена зрелого ИФН и слитого гена, кодирующего химерный полипептид, *содержащий* N-концевую аминокислотную последовательность зрелого ИФН и С-концевую последовательность апоA-I *человека* проектировали с использованием компьютерной программы GeneDesigner 2.0 фирмы DNA2.0 (США). Проводили оптимизацию кодонов в генах для эффективной их экспрессии в клетках *P. pastoris*. Синтезированные гены были сначала клонированы в клетках *E. coli* BL 21 (DE3) в составе экспрессирующей плазмиды pPICZ-alphaA (Invitrogen, США) и затем переклонированы в

метилотрофные дрожжи *P. pastoris* шт. X33. Отобранные клоны секретировали как свободную, так и химерную формы ИФН в культуральную среду в количестве 250 мкг и 70 мкг на 1 мл, соответственно. В настоящее время отрабатываются условия препаративного получения и очистки этих рекомбинантных белков.

Литература:
1. *Brennan B.J., Xu Z.X., Grippo J.F. Evaluation of the absolute bioavailability of pegylated interferon alfa-2a after subcutaneous administration to healthy male volunteers: an open-label, randomized, parallel-group study// Clin. Ther. 2012. Vol. 34. № 9. P. 1883-91.*
2. *Huang Y.S., Chen Z., Yang Z.Y., Wang T.Y., Zhou L., Wu J.B., Zhou L.F. Preparation and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferon-alpha2b fusion protein expressed in Pichia pastoris// Eur. J. Pharm Biopharm. 2007. Vol. 67. № 2. P. 301-8.*
3. *Fioravanti J., González I., Medina-Echeverz J., Larrea E., Ardaiz N., González-Aseguinolaza G., Prieto J., Berraondo P. Anchoring interferon alpha to apolipoprotein A-I reduces hematological toxicity while enhancing immunostimulatory properties// Hepatology. 2011. Vol. 53. № 6. P. 1864-73.*

UDC 57.063.8:663.13:578.245:577.112.5/.856

RECOMBINANT STRAINS OF PICHIA PASTORIS PRODUCING FREE AND CHIMERIC FORMS OF HUMAN INTERFERON ALPHA-2B

Pykhtina M.B., Mamaev A.L., Beklemishev A.B.

Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk 630117, st. Academician Timakov, 2
e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

In this study recombinant strains of *Pichia pastoris* yeast obtained, effectively producing a mature interferon alpha-2b human (IFN) and its chimeric form as the polypeptide fused to apolipoprotein A-I (apoA-I). Both forms of IFN secreted into the culture medium.

Key words: synthetic gene, cloning, *Pichia pastoris*, interferon alpha-2b, apolipoprotein A-I, chimeric polypeptides.

Interferon alfa-2 is a widely used cytokine used to treat a variety of viral diseases (viral hepatitis C and B, herpes virus infections, and others), certain types of cancer, immunodeficiency, etc. A significant limitation in the use of interferon for therapeutic purposes is its short half-life in plasma and high toxicity. To increase IFN circulation time in blood and to reduce its toxicity two basic strategies used: obtaining “crosslinked” interferon with polyethylene glycol (PEGylation) [1] or its application in form of complexes obtained as chimeric polypeptides with plasma proteins [2, 3]. J. Fioravanti and coworkers received recombinant chimeric protein IFN - apoA-I using the expression in *E. coli* cells. This chimeric IFN - apoA-I provided an increase in half-life of the protein due to its incorporation in circulating HDL, targeted delivery of interferon in tissues and organs containing receptors for apoA-I and significant reduction of cytokine toxicity [3].

Production of recombinant proteins in *P. pastoris* expression system has several advantages: high yield of proteins of interest secreted into the culture medium, post-translational modification of proteins similar to those in human etc. In this context, the aim of this work was to obtain strains of *P. pastoris*, effectively producing two forms of recombinant secreted as free IFN form and as a chimeric protein with human apoA-I. In the further work we aim to compare immunological and toxic properties of these two forms of interferon.

Nucleotide sequence of mature IFN gene and fusion gene encoding the chimeric polypeptide containing the N-terminal amino acid sequence of mature IFN and C-terminal sequence of apoA-I human were constructed using GeneDesigner 2.0 (DNA2.0 USA). Codon optimization was carried out for efficient expression in *P. pastoris* cells. The genes were synthesized, cloned in pPICZ-alphaA expression plasmid (Invitrogen, USA) and transformed into E. coli BL 21 (DE3) cells. Two plasmids were prepared and used for transformation of methylotrophic yeast *P. pastoris* X-33 strain. Selected clones secrete both free and chimeric forms of IFN into the culture medium in an amount of 250 μg and 70 μg per 1 ml, respectively. Conditions of preparative producing and purification of these recombinant proteins are ongoing.

References:
1. *Brennan B.J., Xu Z.X., Grippo J.F. Evaluation of the absolute bioavailability of pegylated interferon alfa-2a after subcutaneous administration to healthy male volunteers: an open-label, randomized, parallel-group study// Clin. Ther. 2012. Vol. 34. № 9. P. 1883-91.*

2. *Huang Y.S., Chen Z., Yang Z.Y., Wang T.Y., Zhou L., Wu J.B., Zhou L.F. Preparation and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferon-alpha2b fusion protein expressed in Pichia pastoris// Eur. J. Pharm Biopharm. 2007. Vol. 67. № 2. P. 301-8.*
3. *Fioravanti J., González I., Medina-Echeverz J., Larrea E., Ardaiz N., González-Aseguinolaza G., Prieto J., Berraondo P. Anchoring interferon alpha to apolipoprotein A-I reduces hematological toxicity while enhancing immunostimulatory properties// Hepatology. 2011. Vol. 53. № 6. P. 1864-73.*

УДК 57.085.23

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БОЛИГОЛОВА ПЯТНИСТОГО (*CONIUM MACULATUM L.*) *IN VITRO* И *IN VIVO*

Филонова М. В [1,2], Пулькина С.В. [1], Медведева Ю.В. [1], Чурин А. А. [1,2]

[1] НИ Томский государственный университет, Томск, Россия
[2] НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ РАН Томск, Россия 634050, Томск пр. Ленина, 36 корп. 1
e-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru

Получена культура болиголова пятнистого *in vitro*, перспективного источника физиологически активных веществ. Проведены цитогенетические исследования по изучению генетической изменчивости клеток в каллусе болиголова, обнаружена генетическая нестабильность культуры.

Ключевые слова: Conium maculatum L., культура in vitro, полиплоидия; анеуплоидия

Болиголов пятнистый, растение семейства зонтичные, лекарственные свойства которого известны со времен Гиппократа, широко используется в традиционной медицине многих стран. Препараты болиголова обладают антиноцицептивным (Arihan et al. 2009), успокаивающим, противосудорожным, противовоспалительным и очень сильным иммуностимулирующим действием, благодаря чему болиголов включен в большинство сборов трав для лечения широкого спектра заболеваний, в том числе и онкологических.

Токсичные свойства болиголова определяются содержащимися в нем алкалоидами (кониин, γ-коницеин и др.). Так же растение содержит другие активные вещества, а именно - эфирные масла, флавоноиды, кумарины и фуранокумарины, стерины, сапонины (Radulovic and Dordevic, 2011) и др.

Технология *in vitro* позволяет регулировать рост растительных клеток и накопление ими биологически активных веществ (БАВ). Оценка цитогенетических характеристик изучаемого лекарственного растения является основой для успешного привлечения вида в культуру. Нами была получена каллусная культура болиголова пятнистого.

Задачей нашего исследования – оценить цитогенетические характеристики каллусной культуры болиголова пятнистого.

Определение числа хромосом у болиголова пятнистого в пределах ареала показало, что данный вид сохраняет его постоянным на диплоидном уровне 2n=22 (IPCN, 2016). В двух природных популяциях отмечено наличие хромосомного полиморфизма, обусловленное присутствием 1 В хромосомы (Constantinidis et al., 1997), (Lovkvist and Hultgard, 1999). По нашим данным при анализе клеток корневой меристемы проростков, выращенных из семян интактных растений число хромосом 2n=22. У двух проростков впервые для данного вида отмечено наличие миксоплоидии 2n=22,44.

Изучение генетической гетерогенности каллусных культур болиголова пятнистого нами в литературе не встречено. В результате анализа каллусной культуры 0 пассажа отмечено наличие клеток с диплоидным и тетраплоидным числом хромосом 2n=22 и 4x=44. При длительном культивировании в каллусной культуре 31 пассажа отмечено повышение генетической гетерогенности, связанное как с уменьшением числа диплоидных клеток, увеличения числа тетраплоидных клеток, так и появления триплоидных и анеуплоидных клеток (2n=22, 3x=33, 4x=44, 2n=29).

Литература:

1. *Arihan O, Boz M, Iskit A.B., Ilhan M, Antinociceptive activity of coniine in mice // J. Ethnopharmacol. 2009. Vol. 125/ P. 274–278.*
2. *Constantinidis Th., Kamari G., Phitos, D. A cytological study of 28 phanerogams from the mountains of SE Sterea Ellas, Greece // Willdenowia. 1997. Vol. 27 P.121-142.*
3. *Index to Plant Chromosome Numbers (IPCN) // Missouri Botanical Garden. URL: http://www.tropicos.org/Project/ IPCN (дата обращения: 28.04.2016).*

4. Lovkvist B., Hultgard U.-M..- Chromosome numbers in south Swedish vascular plants // Opera botanica. 1999. Vol. 137. P. 1-42.
5. Madaan R, Kumar S. Screening of alkaloidal fraction of Conium maculatum L. aerial parts for analgesic and antiinflammatory activity // Indian J Pharm Sci. 2012. Vol. 74. P. 457-460.
6. Radulovic N.S., Dordevic N.D. Steroids from poison hemlock (Conium maculatum L.): a GC–MS analysis // J. Serb. Chem. Soc. 2011. Vol.76. № 11. P. 1471–1483.

УДК 57.085.23

CYTOGENETIC RESEARCH OF CONIUM MACULATUM L. *IN VITRO AND IN VIVO*

Filonova M. V.[1,2]_2, Pulkina S. V.[1] Medvedeva J. V.[2], Churin A. A.[1,2]

[1] National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia
[2] Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia.
634050, Lenin Prospekt 36, korp. 1
e-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru

Conium maculatum in vitro culture which is a perspective source of physiologically active agents was produced. Cytogenetic research for genetical cells variation in *Conium maculatum* callus and genetical instability of the culture were studied.

Key words: *Conium maculatum* L., *in vitro* culture, polyploidy; aneuploides.

Conium maculatum is an Apiaceae family plant. Its medicinal properties known at the time of Hippocrates are widely used in traditional medicine of many countries. *Conium maculatum* drugs have antinociceptive (Arihan et al. 2009), sedative, anticonvulsant, anti-inflammatory and immune stimulating effects. That is why, *Conium maculatum* is included in many medicinal herbs for different diseases treatment, including cancer cases.

Toxic properties of *Conium maculatum* are defined by alkaloids (coniine, γ-coniceine and the like). This species contains other active agents such as essential oils, flavonoids, coumarins and furanocoumarins, sterins, saponins (Radulovic and Dordevic, 2011) and the like.

In vitro technology regulates the growth of plant cells and its uptake of biologically active agents. Assessment of cytogenetic characteristics of this species is a basis for successful use in the culture. Callus culture of *Conium maculatum* was produced.

The aim of the research is cytogenetic characteristics assessment of callus culture of *Conium maculatum*.

The determination of chromosome numbers of *Conium maculatum* in the area showed that this species' stability at the diploid level 2n=22 (IPCN, 2016). Two natural populations have chromosome polymorphism at 1 B chromosome (Constantinidis et al., 1997; Lovkvist and Hultgard, 1999). According to our data, when analyzing the cells of seedlings root meristem grown from the seeds of intact plants, the chromosome number is 2n=22. For the first time two seedlings of this species have mixoploidy 2n=22,44.

There has been no investigation of genetical heterogeneity for callus culture of *Conium maculatum*. The result of callus culture analysis (0 passage) shows the presence of cells with diploid and tetraploid chromosome numbers 2n=22 and 4x=44. Long 31 passage cultivation of callus culture demonstrates the increase of genetical heterogeneity. It is explained by the decrease of diploid cells, increase of tetraploid cells and triploid and aneuploid cells (2n=22, 3x=33, 4x=44, 2n=29).

References:

1. Arihan O, Boz M, Iskit A.B., Ilhan M, Antinociceptive activity of coniine in mice // J. Ethnopharmacol. 2009. Vol. 125/ P. 274–278.
2. Constantinidis Th., Kamari G., Phitos, D. A cytological study of 28 phanerogams from the mountains of SE Sterea Ellas, Greece // Willdenowia. 1997. Vol. 27 P.121-142.
3. Index to Plant Chromosome Numbers (IPCN) // Missouri Botanical Garden. URL: http://www.tropicos.org/Project/IPCN (дата обращения: 28.04.2016).
4. Lovkvist B., Hultgard U.-M..- Chromosome numbers in south Swedish vascular plants // Opera botanica. 1999. Vol. 137. P. 1-42.
5. Madaan R, Kumar S. Screening of alkaloidal fraction of Conium maculatum L. aerial parts for analgesic and antiinflammatory activity // Indian J Pharm Sci. 2012. Vol. 74. P. 457-460.

6. Radulovic N.S., Dordevic N.D. Steroids from poison hemlock (Conium maculatum L.): a GC–MS analysis // J. Serb. Chem. Soc. 2011. Vol.76. № 11. P. 1471–1483.

УДК 57.085.23

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ БОРЦА БОРОДАТОГО *ACONITUM BARBATUM* PATR. EX PERS.

Филонова М. В[1,2], Медведева Ю.В. [1], Чурин А. А. [1,2]

[1] НИ Томский государственный университет, Томск, Россия
[2] НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ РАН Томск, Россия 634050, Томск пр. Ленина, 36 корп. 1
e-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru

Получена каллусная культура борца бородатого, источника ценных биологически активных веществ. Планируется осуществить подбор оптимальных условий для культивирования, а так же проведение химического анализа культуры.

Ключевые слова: *Aconitum barbatum*, каллусная культура

Борец бородатый (Aconitum barbatum Patr. ex Pers.)- растение семейства Лютиковые (Ranunculaceae Juss), хорошо известен в тибетской и монгольской медицине, редкий вид, имеет невысокую численность и ограниченное распространение в Томской области (Некратова, 2014). Борец содержит дитерпеновые алкалоиды, такие как – делькозин, ликоктонин, зонгорин, батаконин (Batbayar et al., 1988), кордин (Li-Mei Sun et al., 2009) и др. В народной медицине используется для лечения заболеваний ревматического происхождения, простуде и невралгиях (Некратова, 2014), обладают болеутоляющим (Li-Mei Sun, 2009) и противоопухолевым свойствами (Koji Wadaa et al., 2015).

Широкий спектр фармакологической активности борца бородатого обусловлен содержание биологически активных веществ (БАВ). Получение достаточного количества растительного сырья для выделения БАВ затруднено из-за невысокой численности популяции растения. Клеточная культура борца позволит получить достаточное количество биомассы в относительно короткое время, в контролируемых условиях, что является явным преимуществом такого способа для получения биологически активных веществ по сравнению с получением ее из природного сырья.

В то же время получение культуры алкалоидоносных растений in vitro затруднено, предположительно, из-за выделения ядовитых соединений в питательную среду, которые значительно снижают жизнеспособность клеток (Мигранова И.Г).

Задачей нашего исследования являлось получение клеточной культуры борца бородатого.

Для получения каллусной ткани Aconitum barbatum использовали этиолированные проростки, которые разделяли на экспланты и помещали на питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением гормонов 2-4 D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) и 6-БАП (6- бензиламинопурин).

В результате проведенной работы была получена каллусная культура борца, особенностью которой является наличие органогенеза. В дальнейшем планируется культивирование каллуса на селективных средах, оптимизация условий культивирования, изучение ростовых параметров, определение жизнеспособности, а так же проведение химического анализа на содержание биологически активных веществ в культуре.

Литература:

1. Batbayar N., Batsuren D., Sultankhodzhaev M. N., Yunusov M. S. Alkaloids of Aconitum barbatum. Structure of bataconine // Chemistry of Natural Compounds. 1988. Vol. 24. № 2. P. 200–202.
2. Li-Mei Sun, Ze-Dong Nan, Hong-Li Huang, Wen-Hai Li, Cheng-Shan Yuan Chemical constituents of Aconitum barbatum var. puberulum // Chemistry of Natural Compounds. 2009. Vol. 45. No. 6. P. 934.
3. Koji Wadaa , Emika Ohkoshi, Yu Zhao, Masuo Goto, Susan L. Morris-Natschke, Kuo-Hsiung Lee Evaluation of Aconitum diterpenoid alkaloids as antiproliferative agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2015. Vol. 25. № 7. P. 1525–1531.
4. Некратова А.Н. Редкие лекарственные растений Томской области и их выращивание // Вестник КрасГАУ. 2014. № 5. С. 88-90.
5. Мигранова И.Г. Анализ каллусной ткани Aconitum septentrionale Koelle: Физиологические и генетические аспекты: автореф. дис. канд. биол. наук.– Уфа, 2000. – С. 102.

УДК 57.085.23

CALLUS CULTURE PRODUCTION OF ACONITUM BARBATUM PATR. EX PERS.

Filonova M. V.[1,2]_1, Medvedeva J. V.[2], Churin A. A.[1,2]

[1] National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia
[2] Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia.
634050, Lenin Prospekt 36, korp. 1
e-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru

Callus culture of *Aconitum barbatum* Patr. ex Pers. which is a very rich source of biologically active substances was produced. Selection of optimal conditions for cultivation and chemical analysis of this culture will be investigated.

Key words: *Aconitum barbatum*, *callus culture*

Aconitum barbatum Patr. ex Pers. (*Ranunculaceae* Juss family) is widely known in Tibetan and Mongolian medicine. This rare species is not numerous and has a limited area on the territory of the Tomsk region (Nekratova, 2014). *Aconitum barbatum* includes diterpenoid alkaloids such as delcosine, lycoctonine, songorine, bataconine (Batbayar et al., 1988), corydine (Li-Mei Sun et al., 2009) and the like. It is used for rheumatic diseases, colds and neuralgia (Nekratova, 2014) and provides an analgesic effects (Li-Mei Sun, 2009) and antitumor properties (Koji Wadaa et al., 2015).

A wide range of pharmacological activities of *Aconitum barbatum* is conditioned by biologically active agents (BAA). A small plant population of *Aconitum barbatum* is the reason of insufficient quantity of herbal substances for biologically active agents release. Cell culture of *Aconitum* helps to get a sufficient number of biomass within a short period of time and controlled conditions. These factors are the main advantages of this method for biologically active agents release in comparison with natural raw material release.

At the same time the production of alkaloid-containing plants *in vitro* is difficult. Probably it happens because of discharge of toxic chemicals into a nutrient solution which decrease the viability of the cells (Migranova I.G.).

The aim of the research is cell culture production of *Aconitum barbatum*.

Etiolated seedlings dived into explants were immersed into Murashige and Skoog medium with hormones 2-4 D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and 6-BAP (6- Benzylaminopurine acid) for callus tissues production of *Aconitum barbatum*.

The result of the research is Callus culture production of *Aconitum barbatum* which is characterized by organogenisis. Further work will include callus cultivation on selective solutions, optimization of cultivation conditions, study of growth parameters, a vitality test, a chemical analysis for biologically active agents in this culture.

References:

1. *Batbayar N., Batsuren D., Sultankhodzhaev M. N., Yunusov M. S. Alkaloids of Aconitum barbatum. Structure of bataconine // Chemistry of Natural Compounds. 1988. Vol. 24. № 2. P. 200–202.*
2. *Li-Mei Sun, Ze-Dong Nan, Hong-Li Huang, Wen-Hai Li, Cheng-Shan Yuan Chemical constituents of Aconitum barbatum var. puberulum // Chemistry of Natural Compounds. 2009. Vol. 45. No. 6. P. 934.*
3. *Koji Wadaa , Emika Ohkoshi, Yu Zhao, Masuo Goto, Susan L. Morris-Natschke, Kuo-Hsiung Lee Evaluation of Aconitum diterpenoid alkaloids as antiproliferative agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2015. Vol. 25. № 7. P. 1525–1531.*
4. *Nekratova A.N. Redkie lekarstvennye rastenij Tomskoj oblasti i ih vyrashchivanie // Vestnik KrasGAU. 2014.№ 5. P. 88-90.*
5. *Migranova I.G. Analiz kallusnoj tkani Aconitum septentrionale Koelle Fiziologicheskie i geneticheskie aspekty: avtoref. Dis. kand. biol. nauk. – Ufa, 2000. - P 102.*

УДК 579.864.1

СПЕКТР ДЕЙСТВИЯ И ПРИРОДА АНТИМИКРОБНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Гаврилова Н. Н., Ратникова И. А., Саданов А. К., Баякышова К., Турлыбаева З. Ж., Утегенова Н.М., Чугай О. Г.

Институт микробиологии и вирусологии Комитет науки, Министерство образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан
050010, Алматы, ул. Богенбай батыра 103
e-mail: iratnikova@list.ru

Отобраны штаммы пробиотических бактерий, обладающие антагонизмом в отношении патогенов человека и животных. Изучены особенности биосинтеза и природа продуцируемых ими антимикробных веществ.

Ключевые слова: молочнокислые, пропионовокислые, бифидобактерии, антагонизм, антибиотические комплексы, первичная идентификация.

Результаты исследований показали, что отобранные штаммы молочнокислых, пропионовокислых, бифидобактерий и их ассоциации с высокой антагонистической активностью к возбудителям кишечных заболеваний являются также антагонистами к таким тест-культурам, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans, Aspergillus niger, Staphilococcus aureus, Bacillus subtilis, Vibrio cholerae, Bacillus anthracis, Bacterium coratovorum, Bacillus mycoides, Pasteurella multocida*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Mycobacterium* B-5 и др. Выявлена зависимость антагонистической активности пробиотических бактерий от состава питательной среды. Исследования антагонистической активности лактобактерий к вновь выделенным клиническим штаммам сальмонелл и колибактерий показали необходимость постоянного отбора антагонистов. Выявлены ассоциации на основе молочнокислых бактерий, активные в отношении возбудителей заболеваний пчел (*Citrobacter sp.*, *Hafnia sp.*, *Streptoccocus pluton*, *Bacillus alvei*, *Bacillus larve*, *Ascosphera apis*). Показана высокая антагонистическая активность in vivo подобранной нами ассоциации из молочнокислых и пропионовокислых бактерий в отношении возбудителей воспалительных заболеваний. Установлено, что антагонизм исследуемых штаммов обусловлен биосинтезом ароматических кислот и их производных, соединений белковой природы, а также лизоцимной активностью.

.....

UDC 579.864.1

SPECTRUM OF ACTIVITY AND NATUREANTIMICROBIC SUBSTANCES OF PROBIOTIC BACTERIA

Gavrilova N. N., Ratnikova I. A., Sadanov A. K., Bayakyshova K., Turlybayeva Z. Zh., Utegenova N.M., Chugay O.G.

Institute of microbiology and virology of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, Bogenbay batyr St.,103
e-mail: iratnikova@list.ru

Selected strains of probiotic bacteria having antagonism against human and animal pathogens. The features of biosynthesis and nature of the antimicrobial substances producted by them are studied.

Key words: lactic acid, propionic acid, bifidobacteria, antagonistic activity, antibiotic complexes, primary identification

The results of researches showed that the selected strains of lactic acid, propionic acid, bifidobacteria and their associations with a high antagonistic activity against agents of intestinal diseases are also antagonists to such test cultures as *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Bacterium coratovorum*, *Bacillus mycoides*, *Pasteurella multocida*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Mycobacterium* B-5. The correlation between antagonistic activity of probiotic bacteria and composition of a nutrient medium is revealed. The investigation of antagonistic activity of lactic acid bacteria

against clinical strains of Salmonella and Colibacterium showed a necessity of permanent selection of antagonists to this bacteria. On the basis of lactic acid bacteria established active association against pathogens of bees (*Citrobacter spp., Hafnia sp*., *Streptoccocus pluton*, *Bacillus alvei*, *Bacillus larve*, *Ascosphera apis*).

The high antagonistic activity of selected association of lactic acid and propionic acid bacteria against pathogens of inflammatory diseases in vivo is shown. Showed that the antagonistic activity of tested strains is based on biosinthesis of aromatic acids and theirs derivatives, bacteriocins-peptides, as well lisozim activity.

.....

УДК 578.832

ИЗУЧЕНИЕ БИОДОСТУПНОСТИ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРЕПАРАТА «ГЛАБИЛОКС»

Алексюк П.Г., Богоявленский А.П., Молдаханов Е.С., Алексюк М.С., Березин В.Э.

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан
050010, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, д. 103.
e-mail: pagenal@bk.ru

В представленной работе проводились исследования биодоступности иммуностимулирующего препарата «Глабилокс» созданного на основе растительных тритерпеновых сапонинов. Установлено, что исследуемый препарат обладает высокой степенью биодоступности и полностью выводится из организма через 24 часа.

Ключевые слова: адъювант; биодоступность; доклинические испытания; иммуностимулятор.

К числу наиболее перспективных адъювантов нового поколения относятся биологически активные соединения растительного происхождения - тритерпеновые сапонины [1]. Сапонины способны стимулировать формирование гуморального и клеточного иммунного ответа, что, в итоге, приводит к повышению эффективности вакцинопрофилактики, при включении их в состав вакцинных препаратов [2].

В свою очередь при разработки новых адъювантов, как и других лекарственных средств, необходимым этапом исследований является изучение их фармакокенетики в рамках доклинических испытаний. Данные по фармакокенетике дают возможность оценить скорость и степень всасывания исследуемых препаратов из места введения, проницаемость через гистогематические барьеры и выведения из организма самого препарата, и продуктов его распада [3].

В представленной работе проводились исследования биодоступности иммуностимулирующего препарата «Глабилокс» созданного на основе растительных тритерпеновых сапонинов.

Препарат «Глабилокс» интраназально вводили белым беспородным мышам в виде 1% раствора в фосфатном буфере (pH 7,4), объём вводимой пробы составлял 100 мкл на мышь. Через 1, 3, 6 и 24 часа после введения исследуемого препарата производили забор крови у подопытных животных. Уровень накопления препарата «Глабилокс» в плазме крови мышей определяли методом ВЭЖХ.

В результате проведённых исследований было установлено, что максимум накопления препарата «Глабилокс» в плазме крови подопытных мышей наблюдали уже через час после интраназального введения, минимальный уровень препарата был зафиксирован через 6 часов. Через 24 часа после введения, препарат «Глабилокс» не удалось обнаружить в плазме крови подопытных мышей.

Литература:
1. *Alving C.R., Peachman K.K., Rao M., Reed S.G. Adjuvants for human vaccines // Curr. Opin. Immunol. – 2012. – Vol. 24, №3. – P. 310-315.*
2. *Paepenmüller T., Müller-Goymann C.C. Influence of Quil A on liposomal membranes // Int. J. Pharm. – 2014. – Vol. 475, №1-2. – P. 138-146.*
3. *Kamath A. V., Iyer S. Preclinical Pharmacokinetic Considerations for the Development of Antibody Drug Conjugates // Pharm Res. – 2015. – Vol. 32, № 11. – P. 3470–3479.*

.....

UDC 578.832

THE STUDY OF BIOAVAILABILITY OF IMMUNOSTIMULATORY PLANT PREPARATION «GLABILOKS»

Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Moldahanov E.S., Alexyuk M.S., Berezin V.E.

RSE «Institute of Microbiology and Virology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan
050010, Republic of Kazakhstan, Almaty, Bogenbai batyr str., 103
e-mail: pagenal@bk.ru

In presented work the research of bioavailability of immunostimulatory preparation «Glabiloks» created on the basis of plant triterpene saponins was carried out. It was established that this preparation has a high degree of bioavailability and completely excreted in 24 hours.

Key words: adjuvant; bioavailability; preclinical trials; immunostimulant.

Among the most promising new generation adjuvants are triterpene saponins - biologically active compounds of plant origin [1]. Saponins are able to stimulate the formation of humoral and cellular immune responses that, eventually, leads to higher efficiency of vaccination, when included in the composition of vaccines [2].

In turn, the development of new adjuvants, as well as other medicines, a necessary stage of research is the study of their pharmacokinetics in preclinical testing. Data on pharmacokinetics provide an opportunity to assess the rate and extent of absorption of investigational products from the site of injection, the permeability through the histohematogenous barriers and excretion of preparation and its decay products [3].

In presented work the research of bioavailability of immunostimulatory preparation «Glabiloks» created on the basis of plant triterpene saponins was carried out.

«Glabiloks» preparation was injected to outbred white mice intranasally as a 1% solution in phosphate buffer (pH 7,4), sample injection volume was 100 microliters per mouse. After 1, 3, 6 and 24 hours after injection of investigated preparation, blood sampling from test animals was carried out. Accumulation level of "Glabiloks" preparation in mice plasma was determined by HPLC.

As a result of investigations it was found that the maximum accumulation of «Glabiloks» preparation in the blood plasma of the treated mice was observed an hour after intranasal introduction, the minimum level of preparation was observed after 6 hours. After 24 hours of introduction, «Glabiloks» preparation could not be detected in the plasma of experimental mice.

References:
1. *Alving C.R., Peachman K.K., Rao M., Reed S.G. Adjuvants for human vaccines // Curr. Opin. Immunol. – 2012. – Vol. 24, №3. – P. 310-315.*
2. *Paepenmüller T., Müller-Goymann C.C. Influence of Quil A on liposomal membranes // Int. J. Pharm. – 2014. – Vol. 475, №1-2. – P. 138-146.*
3. *Kamath A. V., Iyer S. Preclinical Pharmacokinetic Considerations for the Development of Antibody Drug Conjugates // Pharm Res. – 2015. – Vol. 32, № 11. – P. 3470–3479.*

УДК 619:615.284

МИЛЬБЕМИЦИНЫ, АВЕРМЕКТИНЫ И ДРУГИЕ ПРИРОДНЫЕ И ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ 16-ЧЛЕННЫЕ АНТИПАРАЗИТАРНЫЕ МАКРОЛИДЫ. ПЕРСПЕКТИВЫ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА, ФАРМАКОФОРНЫХ СВОЙСТВ И БЕЗОПАСНОСТИ

Джафаров М.Х., **Ковалев Г.И., Мирзаев М.Н., Василевич Ф.И., Заварзин И.В.**

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина», Москва, Россия
109472 Москва, ул. Акад. Скрябина, 23
e-mail: mxd123@mail.ru

Проведены исследования по оценке эффективности новых производных 16-членных антипаразитарных макролидов в поиске наиболее адаптированных для применения в составах препаратов в зависимости от их лекарственных форм и путей введения, а также учитывающих особенностей применения в ветеринарии, медицине и защите растений.

Ключевые слова: 16-членные макролиды, мильбемицины, авермектины, немадектин, 5-О- и 4″-производные авермектиноподобных макролидов.

16-членные антипаразитарные макролиды (природные мильбемицины, немадектины, авермектины и др., и полусинтетические мильбемектин, моксидектин, ивермектин, эприномектин и другие) нашли широкое применение в ветеринарии, медицине и сельском хозяйстве для контроля нематодозов и арахноэнтомозов [1].

Химическое строение субстанций данного класса характеризуются наличием 16-членного лактонного цикла, содержащего бутадиеновый и этиленовый тип двойных связей (в положениях 4, 6, и 10 соответственно), и сочлененного с цис-1-оксагидринден-5(6)-ом (1,4-сочленение) и 6,6-спирокеталем (1,3-сочленение). Данный пентациклический фрагмент является фармакофором антипаразитарного действия (рис. 1).

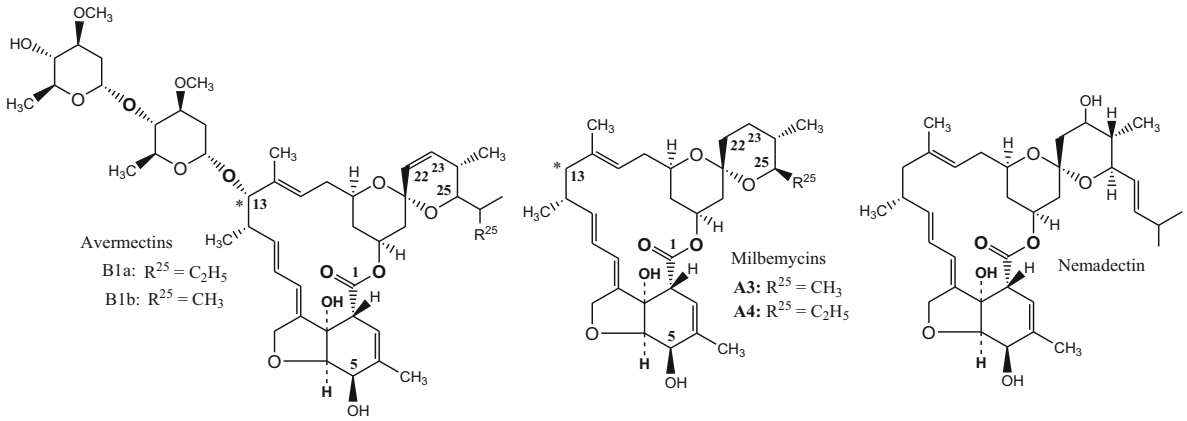


Рис. 1. *Природные авермектин В1, мильбемицины А3/А4 и немадектин.*

Несмотря на то, что все вышеназванные субстанции высокоэффективные нематоинсектоакарициды, эти соединения не полностью идентичны, а индивидуальные различия в степени замещенности пентациклического ядра (фармакофора) и природы заместителей, в той или иной степени, влияют на многие физикохимические и фармакотоксикологические свойства [2].

Нами изучена антипаразитарная эффективность синтезированных новых 5-О- и 4″- производных 16-членных антипаразитарных макролидов (работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: проект №.15-16-00019) в поиске наиболее адаптированных для применения в составах препаратов в зависимости от их лекарственных форм и путей введения, а также учитывающих особенностей применения в ветеринарии, медицине и защите растений. По результатам исследований готовятся заявки на патент.

Литература:

1. *Джафаров М.Х., Василевич Ф.И., Довгалёв А.С., Имамкулиев К.Д., Паутова Е.А. Антигельминтные субстанции: основные классы, проблемы, тенденции развития и перспективы (обзор) // Медицинская паразитология и паразитарные болезни, 2016. №2. С. 47-53.*
2. *Prichard R., Ménez C., Lespine A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. Int. J. for Parasitol.: Drugs and Drug Resistance 2012. 2. P. 134–153.*

UDC 619:615.284

MILBEMYCINS, AVERMECTINS AND OTHER NATURAL AND SEMISYNTHETIC 16-MEMBERED ANTIPARASITIC MACROLIDES. PROSPECTS FOR IMPROVING QUALITY, PHARMACOPHORE PROPERTIES AND SECURITY

Dzhafarov M. Kh., Kovalev G.I, Mirzaev M.N., Vasilevich F.I., Zavarzin I.V.

K .I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Moscow, Russian Federation
109472, Akademika Skryabina street, 23
e-mail: mxd123@mail.ru

The studies have been carried out to assess the effectiveness of new derivatives of 16-membered antiparasitic macrolides in finding the most adapted for use in the composition of drugs according to their dosage forms and routes of administration, and taking into account the features of application in medicine, veterinary medicine and plant protection.

Key words: 16-membered macrolides, milbemycins, avermectins, nemadectin, antiparasitics, 5-O- and 4”-derivatives of avermectin-like macrolides.

16-membered antiparasitic macrolides (natural milbemycins, nemadectin, avermectins, etc., and semisynthetic milbemectin, moxidectin, ivermectin, eprinomectin and others) have found broad use in medicine, veterinary medicine and agriculture for the control of nematosis and arachnoentomosis [1].

The chemical structure of the substances of this class are characterized by the presence of the 16-membered lactone ring containing butadiene and ethylene type double bonds (at positions 4, 6, and 10, respectively), and fused with the cis-1-oxahydrinden-5(6) (1,4-junction) and 6.6-spiroketal (1,3- junction). This pentacyclic fragment is the pharmacophore of antiparasitic action (Fig. 1).

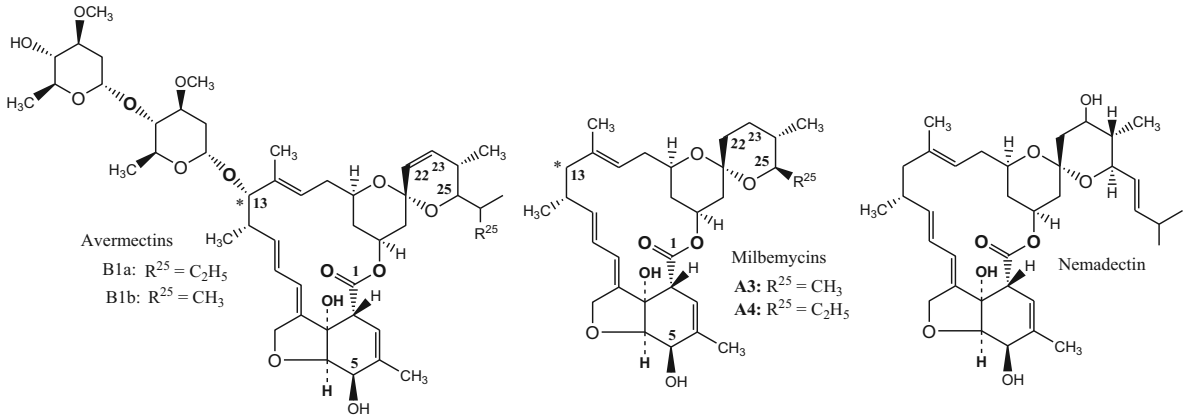


Fig. 1. *Natural avermectins B1a/ B1b, milbemycins A3/A4 and nemadectin.*

Despite the fact that all of the above substances are highly effective nematocide and insectoacaricides, these compounds are not completely identical, and individual differences in the degree of substitution of pentacyclic nucleus (pharmacophore) and the nature of the substituents, in one degree or another, affect many physicochemical and pharmacotoxicological properties [2].

We have studied the anti-parasitic efficiency of new synthesized 5-O - and 4”-derivatives of 16-membered antiparasitic macrolides (supported by Russian Science Foundation, grant № 15-16-00019) in search of the most adapted for use in the composition of drugs according to their dosage forms and routes of administration, and taking into account the features of application in veterinary medicine and plant protection. According to research results are preparing the patent applications.

References:

1. Dzhafarov M. Kh., Vasilevich F.I., Dovgalev A.S., Imamkuliev K.D., Pautova E.A. Anthelmintic substances: main

classes, problems, trends in development and prospects // Med Parazitol (Mosk) - 2016, N 2., p. 47-53.
2. *Prichard R., Ménez C., Lespine A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity // Int. J. for Parasitol.: Drugs and Drug Resistance 2012. 2. P. 134–153.*

УДК 606:663.051

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОПРОТЕКТОРОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Меркулова А.А.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина
Москва, Россия
109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23
e-mail: anutochka559@yandex.ru

Предложен метод иммобилизации биологически активных веществ, содержащихся в экстрактах лекарственных растений на гиалуроновую кислоту, полученной из побочных продуктов птицеперерабатывающего производства. Показана возможность получения устойчивых биокомплексов. Проведена идентификация веществ, иммобилизированных на гиалуроновую кислоту, методом масс-спектрометрии с лазерной десорбцией и ионизацией (МАЛДИ).

Ключевые слова: иммобилизация, биологически активные вещества (БАВ), экстракт расторопши, экстракт листа красного винограда, гиалуроновая кислота (ГК), биологически активные субстанции, побочные продукты, птицеперерабатывающее производство.

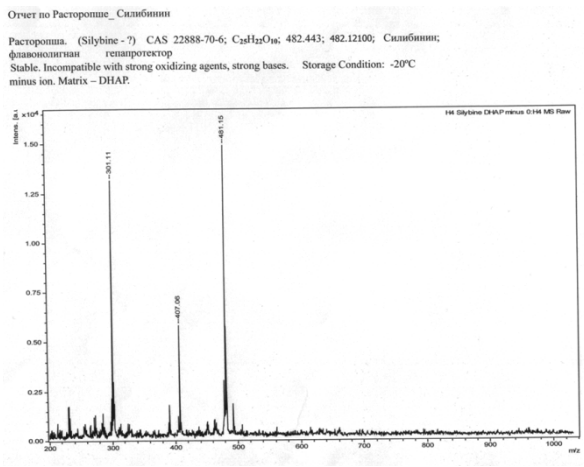
Комплекс физико-химических свойств и размеры молекулы гиалуроновой кислоты, обладающей большой молекулярной массой, свидетельствует о том, что она может служить матрицей для иммобилизации различных биологически активных веществ, с меньшей молекулярной массой [2].

Такой методический прием позволяет создавать в организме «депо» для постепенного выхода БАВ во внутренние среды организма, пролонгировать их пребывание в биологически активном состоянии, в ряде случаев может снизить токсичность и усилить направленность действия[1].

На первом этапе исследований была отработана серия технологических приемов по получению ГК из гребней кур и половозрелых петухов. Следующий этап заключался в получении устойчивых комплексов на основе ГК и экстрактов расторопши и листа красного винограда. Иммобилизацию проводили за счет изменения изоэлектрической точки белков в процессе комплексообразования с ГК. Далее с помощью метода МАЛДИ были проведены исследования по выявлению действующих веществ, присутствующих в экстрактах расторопши и листа красного винограда иммобилизированных на гиалуроновую кислоту.

Нами установлено, что при использовании экстракта расторопши, гиалуроновая кислота вступает в комплексообразование с таким веществом как силибин (силимарин, силибинин). На основании данных, характеризующих молекулярную формулу, была рассчитана молекулярная масса силибина. Молекулярная формула: C25H22O10. Молекулярная масса: 482.44 У.е. При анализе комплеса ГК с экстрактом листа красного винограда было установлено, что основным действующим веществом, вступающим в комплексообразование, является ресвератрол. Молекулярная формула: C14H12O3. Молекулярная масса: 228.2433 У.е.

При анализе графиков (рис.1, рис. 2), полученных при исследовании образцов методом МАЛДИ, были выявлены выраженные изменения кривой графика на отметках 481.15 в образце с экстрактом расторопши и на 228.3 в образце с экстрактом листа красного винограда.


Отчет по Расторопше_ Силибинин
Расторопша. (Silybine - ?) CAS 22888-70-6; C25H22O10; 482.443; 482.12100; Силибинин;
флавонолигнан гепапротектор
Stable. Incompatible with strong oxidizing agents, strong bases. Storage Condition: -20ºC
minus ion. Matrix – DHAP.
Hit Silybine DHAP minus 0 Hit MS Raw
481.15
481.15
481.15

УДК 606:663.051

THE USE OF HYALURONIC ACID AS A MATRIX FOR IMMOBILIZATION BIOPROTECTORS VEGETABLE ORIGIN

Merkulova A.A.

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MBA behalf of KI Scriabin
109472, Moscow, st. Academician Skryabin, d. 23
e-mail: anutochka559@yandex.ru

A method for immobilization of biologically active substances contained in extracts of medicinal plants for hyaluronic acid obtained from the Poultry byproduct production. The possibility of obtaining stable biocomplexes. Identification of substances immobilized on hyaluronic acid, by mass spectrometry with laser desorption and ionization (MALDI).

Key words: immobilization of biologically active substances (BAS), milk thistle extract, red vine leaves, hyaluronic acid (HA), the biologically active substances, by-products, poultry processing industry.

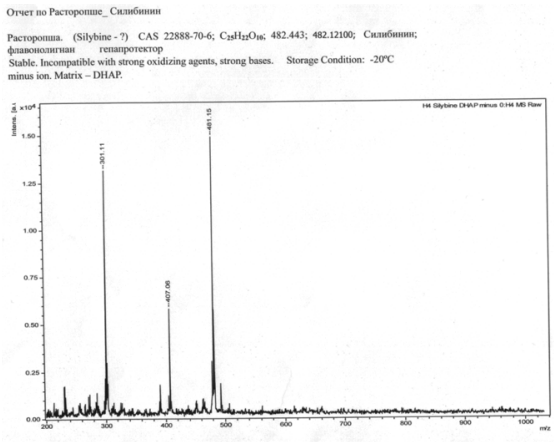
Complex physico-chemical properties and dimensions of the molecules of hyaluronic acid having high molecular weight, indicating that it may serve as a matrix for the immobilization of various biologically active substances with a lower molecular weight [2].

This methodological procedure allows you to create in the body “depot” for the gradual release of biologically active substances in the internal environment of the body, to prolong their stay in a biologically active state, in some cases, may reduce toxicity and enhance the focus of actions [1].

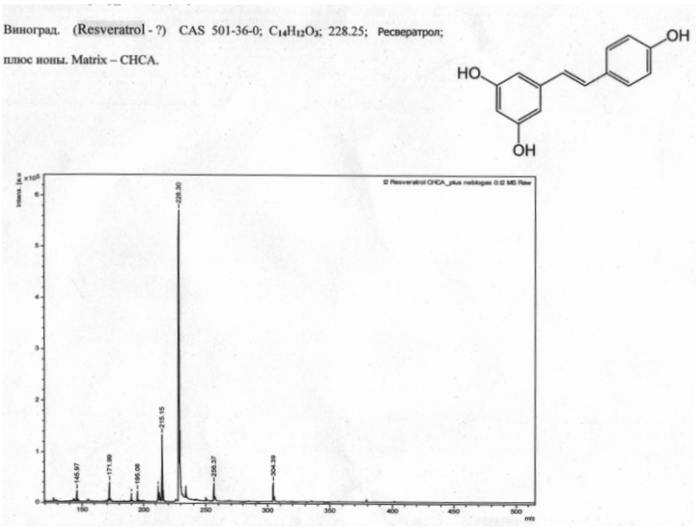
In the first phase of research was worked out a series of processing methods for the production of HA from chicken combs and adult males. The next step was to obtain stable complexes based on HA and extracts of milk thistle and red vine leaves. Immobilization was carried out by changing the isoelectric point of the protein in the process of complexation with HA. Next, a method using MALDI studies were conducted to identify the active ingredients present in extracts of Silybum red vine leaf and immobilized on hyaluronic acid.

We have found that when using milk thistle extract, hyaluronic acid enters into complexation with stuff like silybin (silymarin, silibinin). On the basis of data characterizing the molecular formula, molecular weight silybin was calculated. Molecular formula: C25H22O10. Molecular weight: 482.44 USD When analyzing komples HA with red vine leaf extract it has been found that the main active ingredient entering into the complexation is resveratrol. Molecular formula: C14H12O3. Molecular weight: 228.2433 USD

When analyzing the graphs (Figure 1, Fig. 2), obtained in the study by MALDI samples were found pronounced changes in the schedule of the curve at elevations 481.15 in a sample with an extract of milk thistle and 228.3 in a sample with an extract of red vine leaves.



Picture 1 *- Mass Spectrometry biocomplex hyaluronic acid and extract of milk thistle*



Picture 2 *- Mass Spectrometry biocomplex hyaluronic acid and extract of red vine*

Thus, it was found that in the samples occurred successfully immobilization basic active substances are plant extracts with a HA gel to form a stable complex.

References:
1. *V.N. Khabarov Hyaluronic acid: production, properties, applications in biology and medicine / V.N.Habarov, P.Ya.Boykov, M.A.Selyanin. M .: Practical Medicine, 2012.-224 with.*
2. *Fedorischev IA Hyaluronic acid: Monografiya.-Book 1. Tula: Tula State University Publishing House, 2011.-238c.*
3. *Pasch H., Schrepp W. MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers. - Springer, 2003. - 298 p.*
4. *Knochenmuss R., Zenobi R. MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes // Chem. Rev. 2003. V. 103. P. 441-452.*
5. *Barbuddhe S.B., Maier T., Schwarz G. et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. No.. 17. P. 5402-5407.*
6. *Atabaeva, HN, NS Umarov Medicinal plants in veterinary medicine: a textbook / HN Atabaeva, NS Umarov. - Tashkent, 2013. - 159s.*

.....

УДК 619: 615.038

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ ОРГАНО-НЕОРГАНИЧЕСКОГО КОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА СТИБАТА НАТРИЯ С ОКСИДОМ КРЕМНИЯ И МЕЛАНИНОВ ГРЕЧИХИ

Мирзаева К.М.[1], Хури М.М.[2], Бессарабова Е.В.[1], Джамбулатов З.М.[1], Куликов В.В.[2]

[1] Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственное объединение «ЭКОБИО-ВЕТ»109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23 стр.8
[2] Общество с ограниченной ответственностью «РАМ», Москва, Россия
115088, г. Москва, ул. Шарикоподшипниковская, д.1 оф. 1 ЭТ5-К22А
e-mail: niacid@yandex.ru

Представлены результаты изучения параметров острой и хронической токсичности, аллергенности и иммунотоксичности композита на основе Полисорбина и Меланина. Показано, что исследуемый композит относится к безвредным веществам и является перспективным сырьем для получения препаратов ветеринарного и медицинского назначения.

Ключевые слова: Полисорбин, Меланин, композит, сополимер стибата натрия с оксидом кремния, полифенольный комплекс гречихи, токсичность, аллергенность, кумулятивность.

Композиты, содержащие в своем составе биологически активные ингредиенты, являются перспективными материалами для получения препаратов медицинского и ветеринарного назначения. Поэтому они должны быть детально изучены на возможную токсичность, аллергенность, кумулятивность и др.

Данная работа посвящена исследованию параметров острой и хронической токсичности, аллергенности и иммунотоксичности композита на основе Полисорбина (сополимер стибата натрия с оксидом кремния) и Меланина (полифенольный комплекс гречихи). В качестве подопытных животных использованы белые мыши, крысы, морские свинки, куры.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что острая токсичность композита при внутрижелудочном (в/ж) введении мышам находится в пределах ЛД50 = 3388,5 – 3712,9 мг/кг, при в/ж введении крысам ЛД50 = 4120,00 - 4650,05 мг/кг. Эти данные позволяют отнести препарат к малотоксичным веществам (IV класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76).

При хроническом ежедневном (на протяжении 30 дней) в/ж введении вещества крысам в дозе 40 мг/кг летальных эффектов и тенденции к кумуляции не выявлено, также установлено отсутствие аллергенности на морских свинках. Иммунологические характеристики подопытных животных (куры-несушки) оценивали по действию препарата на бактерицидную активность сыворотки крови и активность лизоцима. Установлено, что композит не оказывает негативного воздействия на организм кур-несушек. Препарат, напротив, на 20 - 30 % стимулирует показатели естественной резистентности, и это выражается в повышении содержания лизоцима и бактерицидной активности сыворотки крови подопытных кур.

Таким образом, исследуемый композит, содержащий биологически активные ингредиенты и относящийся к безвредным веществам, представляется весьма перспективным для получения ветеринарных и медицинских препаратов.

УДК 619: 615.038

BIOSAFETY OF ORGANIC - INORGANIC COMPOSITE BASED ON THE COPOLYMER OF STIBAT SODIUM WITH OXIDE SILICON AND MELANIN BUCKWHEAT'S

Mirzaeva K.M.[1], Khoury M.M.[2], Bessarabova E.V.[1], Djambulatov Z.M.[1], Kulikov V.V.[2]

[1] Limited Liability Company Scientific Production Association «ECOBIOVET», Moscow, Russia
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23 bldg. 8
[2] Limited Liability Company «RAM», Moscow, Russia
115088, Moscow, Sharikopodshipnikovskaya St., 1, office 1 F5-K22A
email: niacid@yandex.ru

The results of the study parameters of acute and chronic toxicity, allergenicity and immunotoxicity based composite Polisorbin and Melanin are presented. It is shown that the investigated composite relate to harmless substances and is a perspective raw material for production of veterinary and medical drugs.

Key words: Polisorbin, Melanin, composite, copolymer of stibat sodium with oxide silicon, polyphenol complex buckwheat's, toxicity, allergenicity, cumulative.

Composites containing in its composition biologically active ingredients are perspective materials for creating preparations for medical and veterinary use. Therefore, they should be studied in detail at the possible toxicity, allergenicity, cumulative and others.

This research work is devoted to exploration of the parameters of acute and chronic toxicity, allergenicity and immunotoxicity of composite based on Polisorbin (copolymer of stibat sodium with oxide silicon) and Melanin (polyphenol complex buckwheat's). The experimental animals used as white mice, rats, cavies, hens.

These results indicate that the acute toxicity of composite in intragastric (i/g) administration into mice was within LD_{50} = 3388,5 - 3712,9 mg / kg and into rats (i/g) was within LD_{50} = 4120,00 - 4650,05mg / kg. These data refer the drug to low-toxic substances (IV class of danger according to GOST 12.1.007-76).

In chronic daily (for 30 days) i/g administration of substance to rats at a dose of 40 mg / kg lethal effects and tendency to cumulation have not been identified, also was established the absence of allergenicity in cavies.

The immunological characteristics of the experimental animals (laying hens) were evaluated by the action of the drug on the bactericidal activity of serum and lysozyme activity. It was found that the composite has no negative effects on the organism of laying hens. The drug, in contrast, stimulates the indices of the native resistance on 20 -30 per cent and it results in an increase of lysozyme and bactericidal activity of blood serum guinea hens.

Thus, the analyzed composite containing biologically active ingredients and belonging to harmless substances, it is very perspective for creating medical and veterinary preparations.

УДК 619: 615.038

КОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА СТИБАТА НАТРИЯ С ОКСИДОМ КРЕМНИЯ И МЕЛАНИНОВ ГРЕЧИХИ КАК ОСНОВА ПРЕПАРАТОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Хури М.М.[1], Мирзаев М.Н.[2], Куликов В.В.[1], Мирзаева К.М.[2]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «РАМ», Москва, Россия
115088, г. Москва, ул. Шарикоподшипниковская, д.1 оф. 1 ЭТ5-К22А
[2] Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственное объединение «ЭКОБИОВЕТ», Москва, Россия
109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23 стр.8
e-mail: niacid@yandex.ru

Представлены результаты изучения фармакологических и токсикологических характеристик композита на основе Полисорбина и Меланина. Показано, что исследуемый композит обладает сорбционными, антивирусными и иммуностимулирующими свойствами и может быть рекомендован для получения ветеринарных и медицинских препаратов широкого спектра действия.

Ключевые слова: Полисорбин, Меланин, композит, сополимер стибата натрия с оксидом кремния, полифенольный комплекс гречихи, протектор, сорбция, антивирусные и иммуностимулирующие свойства.

Исследования, проведенные нами с целью выявления фармакологических и токсикологических характеристик сополимера стибата натрия с оксидом кремния (Полисорбин), показали, что это вещество является не только эффективным сорбентом, но и обладает выраженным антивирусным действием. Например, при введении вещества дважды за неделю до экспериментального заражения мышей вирусом гепатита С (HCV) не наблюдается видимых симптомов заболевания или гибели животных в течение месяца (срок наблюдения). Профилактическое введение препарата в дозе 400 мг/кг массы тела не приводило к снижению антигенной активности вируса гепатита С, но снижало его инфекционные титры на 2,3 lg $ТЦД_{50}$.

Для расширения спектра биологической активности, в том числе и антивирусной, нами разработана композиция, получаемая при совместном агрегировании сополимера стибата натрия с оксидом кремния и полифенолов гречихи – меланинов. Достижение поставленной цели базируется на том, что меланины стимулируют синтез цитокинов - TNF-a, IL-6, VEGF (El-Obeid A, Al-Harbi S, AL-Jomah N, Hassib A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production//Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 2006. Vol.13. №5. P.324-333.), а также могут выполнять роль протекторов при действии негативных факторов среды.

Исследуемая композиция, обладающая сорбционными, антивирусными и иммуностимулирующими свойствами, может быть рекомендована в качестве основы новых препаратов широкого спектра биологической активности.

.....

УДК 619: 615.038

COMPOSITE BASED ON THE COPOLYMER OF STIBAT SODIUM WITH OXIDE SILICON AND MELANIN BUCKWHEAT'S AS THE BASIS OF BROAD SPECTRUM DRUGS

Khoury M.M.[1], Mirzaev M.N.[2], Kulikov V.V.[1], Mirzaeva K.M.[2]

[1] Limited Liability Company «RAM», Moscow, Russia
115088, Moscow, Sharikopodshipnikovskaya St., 1 office 1 F5-K22A
[2] Limited Liability Company Scientific Production Association «ECOBIOVET», Moscow, Russia
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23 bldg. 8
e-mail: niacid@yandex.ru

The results of the study of pharmacological and toxicological characteristics of the composite based on Polisorbin and Melanin are presented. It is shown that the analyzed composite having sorptive, antiviral and immunostimulatory properties and can be recommended for production of the veterinary and medicines broad spectrum drugs.

Key words: Polisorbin, Melanin, composite, copolymer of stibat sodium with oxide silicon, polyphenol complex buckwheat's, protector, sorption, antiviral and immunostimulatory properties.

Researches conducted by us for to identify a pharmacological and toxicological characteristics of the copolymer of stibat sodium with oxide silicon (Polisorbin) showed that this substance is not only an effective adsorbent but also has a marked antiviral activity. For example, when administered substance twice per week before the experimental infection of mice with virus of hepatitis C (HCV) was not observed visible symptoms of disease or death of the animals within month (time of the observation). Prophylactic administration at a dose of 400 mg/kg body weight did not lead to a decrease in the antigenic activity of the virus of hepatitis C, but it reduced the infectious titers on 2,3 lg TCD_{50}.

To widen the spectrum of biological activity, including antiviral, we have developed a composition obtainable by co-aggregation of the copolymer of stibat sodium with oxide silicon and polyphenols of buckwheat - melanin.

Expanding the range of biological activity due to the fact that melanins stimulate the synthesis of cytokines - TNF-a, IL-6, (El-Obeid A, Al-Harbi S, AL-Jomah N, Hassib A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production//Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 2006. Vol.13. №5. P.324-333.) and can serve as a protectors from the negative action of negative environmental factors.

The researched composition having sorption, antiviral and immunostimulatory properties, can be recommended as a basis for new drugs with a broad spectrum of biological activity.

УДК 663.1

ЭФФЕКТИВНЫЙ БИОРЕАКТОР ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА В ПРОИЗВОДСТВЕ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Винаров А.Ю., Ковальский Ю.В.

*Акционерное общество «Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ».
109004, Москва, Александра Солженицына, 27.
e- mail: vinarov@hotmail.com)*

С учетом анализа известных биореакторов для культивирования клеток млекопитающих, моделирования процесса и формулирования критериев оптимальности предлагается новая эффективная конструкция биореактора.

Ключевые слова: клетки млекопитающих, биореактор, критерии оптимальности.

Культивирование в монослое на различных поверхностях биореактора культуры клеток, используемых для накопления вирусов, в отличии от традиционного метода их выращивания на куриных эмбрионах, открывает значительные возможности для промышленного производства вакцин и борьбы с вирусными болезнями. При создании оптимальной биотехнологии наряду с технологическими вопросами, в т.ч.: подбором сложной по составу ростовой среды, выбором оптимальной адгезионной поверхности для прикрепления клеток, способа отделения выращенных клеток от подложки и др., важнейшим является разработка эффективной конструкции биореактора. Проведен анализ известных типов аппаратов, применяемых для культивирования клеток млекопитающих, в т.ч.: аппараты роллерного типа, пленочные, мембранные, с полыми волоконными элементами, с микроносителями и предложен новый эффективный биореактор объемом 20 л. Конструкция биореактора исключает стрессовое воздействие на клетки, обеспечивает необходимый транспорт питательных элементов и кислорода, а также накопление большой массы культуры клеток за счет развитой поверхности контакта. Биореактор имеет определенные преимущества перед известными, согласно следующим критериям оптимальности: - максимум отношения рабочей поверхности для формирования клеточного монослоя к объёму аппарата; - минимум отношения расхода достаточной для роста клеток дорогостоящей ростовой среды к массе выращенных клеток. Конструкция аппарата позволяет его масштабирование.

UDC 663.1

EFFICIENT BIOREACTOR FOR CULTIVATION OF ANIMAL AND HUMAN CELLS FOR VIRUS PRODUCTION

Vinarov A.Yu., Kowalsky Yu.V.

"The state scientific-recearch institute of proteim biosynthesis" LTD.
Moscow, Russia, 109004, Moscow, A. Solzhenitsyn str., 27.
e-mail: Vinarov@hotmail.com

On the base of analysis of known bioreactors for cultivation of animal and human cells and modeling process it was proposed a new efficient bioreactor which satisfy to some optimal criteria.

Key words: animal and human cells, bioreactor, optimal criteria.

Cultivation in a monolayer on different surfaces of the bioreactor cell culture used for the accumulation of virus, in contrast to the traditional method of growing them in eggs, provides significant opportunities for the industrial production of vaccines. When creating optimum biotechnology along with technological issues, including: the selection of the composition of complex growth medium, the optimal choice of the adhesive surface for attachment of cells, a method of separating cultured cells from the substrate and etc., the most important task is the development of efficient bioreactor design. The analysis of known types of devices used for the cultivation of mammalian cells, including : roller devices, film apparatus, membrane bioreactors, bioreactor with hollow fiber elements, apparatus with micro-carriers, allowed to propose a new design of efficient bioreactor having certain advantages over the known apparatus, in accordance with optimality following criteria: - maximum of the ratio of the surface forming a cell monolayer to the working volume of the bioreactor; - minimum of the ratio of sufficient expensive growth medium for cell cultivation to the resulting cell mass. Based on these technical requirements and formulated optimality criteria, as well as the previously discussed mathematical model and calculation method, we have developed a new design of the bioreactor with volume of 20 liters, providing the necessary mass transfer rate of nutrients, oxygen, and due to the large surface contact accumulation of great mass cell culture. At the same time, proposed bioreactor excludes stress on the cells, provides easy operation and process scalability.

.....

УДК 579.66

НОВЫЕ ВИДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ БЕЛКОВОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОТХОДАХ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА, ПИЩЕВОЙ И ДЕРЕВООБРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТЕЙ

Воробьева Г.И., Заикина А.И., Сычев А.Е., Буторова И.А., Ковальский Ю.В., Гарибян Ц.С.

Акционерное общество «Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ», 109004, Москва Александра Солженицына, 27
e-mail: gvorobieva@yandex.ru

Разработаны инновационные экологически чистые биотехнологии получения новых видов кормового белкового продукта на отходах разных отраслей хозяйственной деятельности с содержанием сырого протеина 40-60% и наличии в нем всех незаменимых аминокислот, микроэлементов (калий, магний, железо, марганец, цинк), витаминов группы В, витамина РР и других соединений.

Ключевые слова: биотехнологии; кормовой белковый продукт; автолизаты; пробиотики; синбиотики;

Разработаны исходные данные на производство кормового белкового продукта мощностью 10 тыс. т/г. Стоимость заводского оборудования составляет 430 – 450 млн. руб. Стоимость готового продукта в действующих ценах составляет 30 тыс. руб. за тонну при себестоимости 15 тыс. руб. Окупаемость завода - 2- 2,5 года. Рентабельность производства - 55%. Разработана биотехнология получения на базе кормового белкового продукта автолизата, пробиотиков и синбиотиков, ускоряющих рост сельскохозяйственных животных, птицы и мальков осетровых рыб без применения антибиотиков на ранних стадиях выращивания.

Разработаны инновационные экологически чистые биотехнологии получения кормового белкового продукта - на опилках, подвергающихся обработке ферментами амилазой и целлюлазой (содержание сырого протеина в готовом продукте 40-45%); - на свекловичном жоме, обработанном ферментами амилазой и пектиназой (сырой протеин 45-60%); - на послеспиртовой зерновой и гидролизной барде с добавлением и без добавления к ней отрубей (сырой протеин 40-50%). *При этом производство кормового белкового продукта на послеспиртовой барде может быть организовано на недействующих спиртовых заводах после их модернизации.*

.....

UDC 579.66

NEW TYPES OF PROTEIN RICH MICROBIOLOGICAL FODDER FROM WASTE OF AGRICULTURE, FOOD AND WOODWORKING INDUSTRY

Vorobieva G.I., Zaikina A.I., Sitchev A.E., Butorova I.A., Kovalsky Yu.V., Garibyan C.S.

Joint-stock company «State Scientific Research Institute of Protein Biosynthesis»
Moscow, 109004, 27, Aleksandr Solzhenitsyn st.
e-mail:gvorobieva@yandex.ru

Innovative, environmentally friendly biotechnology was developed for to obtain new species of rich protein fodder product from the waste of various sectors of economic activity. The crude protein content in the final product is 40-60%, it contains also all essential amino acids, microelements (potassium, magnesium, iron, manganese, zinc), B vitamins, vitamin PP etc.

Key words: biotechnology; proteinrich fodder; autolysates; probiotics; synbiotics.

Initial data on the production of the protein rich fodder was developed for a sawdust treated with amylase and cellulase; for a beet pulp treated with amylase and pectinase; for the waste after ethanol production with and without addition the thereto of bran (content of the crude protein in an obtained fodder of 40-50%). On the basis of rich protein fodder was developed also the biotechnology of production differentautolysates, probiotics and synbiotics useful for acceleration the growth of livestock, poultry and fry sturgeon without use of antibiotics in the early stages of cultivation.

.....

УДК 66.081.3; 676.083; 663.18

ДЕСОРБЦИЯ БУТАНОЛА И СОПУТСТВУЮЩИХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ИЗ СВЕРХСШИТОГО ПОЛИСТИРОЛЬНОГО СОРБЕНТА СВЧ – ИЗЛУЧЕНИЕМ

Гарибян Ц.С.[1], Бамбура М.В.[1], Дроздов Ф. В.[2]

[1] Акционерное общество «Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ», 109004, Москва, ул. Александра Солженицына, 27
e-mail: tsovinar1980@mail.ru
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН

СВЧ-излучение позволяет эффективно десорбировать органические растворители из сорбента ССПС.

Ключевые слова: *бутанол, СВЧ–излучение, сверхсшитый полистирольный сорбент, десорбция*

Весьма перспективным оказался метод десорбции органических растворителей (на примере бутанола) из сверхсшитого полистирольного сорбента (ССПС) интенсифицированный СВЧ-излучением.

Насыщенный бутанолом и предварительно обезвоженный образец сорбента ССПС MN202, помещали в лабораторную микроволновую систему фокусированного воздействия СВЧ-излучением. В реакционном модуле с магнитной мешалкой и самонастраивающимся СВЧ-резонатором исследуемый образец постоянно находился в однородном поле высокой плотности энергии, что позволяло добиться максимального воздействия микроволнового излучения на образец. Пары десорбируемого вещества,

отсасываемые вакуумным насосом, последовательно проходили ловушку-холодильник, и конденсировались в жидкость, которая накапливалась в приёмной колбе.

Измерения показали, что содержание бутанола в конденсате превышало 87%, что свидетельствует о возможности применения СВЧ-излучения для десорбции бутанола из ССПС. После десорбции сорбент оказался пригодным для повторного использования.

UDC 66.081.3; 676.083; 663.18

DESORPTION OF BUTANOL AND CONCOMITANT ORGANIC SOLVENTS FROM HYPERCROSSLINKED POLYSTERYNE SORBENT BY MICROWAWE RADIATION

Garibyan C.S.[1], Bambura M.V.[1], Drozdov F.B.[3]

[1] Joint-stock company «State Scientific Research Institute of Protein Biosynthesis»
Moscow, 109004, 27, Aleksandr Solzhenitsyn st.
e-mail: tsovinar1980@mail.ru
[2] Institute of Synthetic Polymer Materials Russian Academy of Science.

Microwave radiation allows the effective desorption of organic solvents from the hypercrosslinked polystyrene sorbent.

Key words: butanol, microwave radiation, hypercrosslinked polystyrene sorbent, desorption

Efficiency of the sorption process of organic solvents such as butanol from the acetone-butanol-ethanol fermentation broth ensured not only by sorption properties of a sorbent, but by the desorption of solvents and by the possibility of the sorbent regeneration.

Desorption method of organic solvents (for example, butanol) from hypercrosslinked polystyrene sorbent intensified by microwave radiation was found very promising.

Saturated by butanol and pre-dehydrated sample of the sorbent, were placed in a laboratory microwave system with focused exposure of the microwave radiation. The reaction module with magnetic stirrer and self-tuning of the microwave resonator with the test sample was kept in a uniform field of high energy density, which allows the maximum exposure to microwave radiation to the sample. Steams of desorbed substance were condensed into a liquid, which accumulates in the receiving flask.

Measurements showed that butanol content in the condensate exceeded 87%, which indicates the possibility of the use of microwave radiation for butanol desorption from sorbent. The sorbent after desorption was found suitable for reuse.

УДК 66.081.3; 676.083; 663.18

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ СОРБЦИОННОГО ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ БУТАНОЛА И СОПУТСТВУЮЩИХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ИЗ ФЕРМЕНТАЦИОННОЙ ЖИДКОСТИ

Акопян В.Б. [1], Бамбура М.В. [1], Гарибян Ц. С.[2], Афонин А.В.[1]

[1] Акционерное общество «Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ»
[2] Московскоий политехнический университет Москва, Россия
109004, Москва, ул. Александра Солженицына, 27
e-mail: tsovinar1980@mail.ru

Показана возможность применения низкочастотного ультразвука для интенсификации процесса сорбции бутанола и сопутствующих органических растворителей из среды ацетонобутилового брожения с помощью сорбента ССПС.

Ключевые слова: бутанол, ферментационная жидкость, сверхсшитый полистирол, сорбция, ультразвуковое воздействие.

Эффективным методом увеличения продуктивности процесса выделения бутанола из среды ацетонобутилового брожения является сорбционный метод. В культуральную жидкость (КЖ), отделённой от биомассы и содержащей продукты биосинтеза (бутанол, ацетон, этанол и др.), вводили гидрофобный сорбент ССПС MN202 («Purolite») в соотношении КЖ:ССПС = 10:1. Процесс сорбции растворителей из КЖ, ускоряли ультразвуком (УЗ) с частотой 22 кГц, плотности акустической мощности 0,5 Вт/см^3, 60 с. Отделяли сорбент от жидкости и определяли содержание бутанола, ацетона и этанола в пермеате методом газожидкостной хроматографии. После введения ССПС MN202 в КЖ значительно уменьшились концентрации органических растворителей, в частности степень извлечения бутанола достигала 80%. Применение УЗ позволяет значительно сократить время насыщения сорбента бутанолом, упростить процесс, сократить энергозатраты, а также совмещать данный процесс с процессами ферментации.

UDC 66.081.3; 676.083; 663.18

INTENSIFICATION THE SORPTION OF BUTANOL AND RELATED ORGANIC SOLVENTS FROM A FERMENTATION BROTH

Akopyan V.B.[1], Bambura M.V.[1], Garibyan C.S.[2], Afonin A.V.[1]

[1] Joint-stock company «State Scientific Research Institute of Protein Biosynthesis»
[2] Moscow Polytechnic University, Moscow, Russia
Moscow, 109004, 27, Aleksandr Solzhenitsyn st.
e-mail: tsovinar1980@mail.ru

The possibility of low-frequency ultrasound was shown for an intensification of sorption the butanol and related organic solvents from the medium of acetone-butanol-ethanol fermentation by using the hypercrosslinked polystyrene sorbent .

Key words: butanol fermentation liquid, hypercrosslinked polystyrene sorbent, ultrasonic treatment.

Using of all known technologies and devices for the butanol extraction from fermentation media involve high costs caused by a high temperature of the butanol boiling or by the need for frequent replacement of working elements of devices for extraction.

A rather effective method to increase the productivity of the process of separation the butanol from the acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation medium (FM) is the sorption method.

In the culture fluid (FL) of ABE fermentation containing butanol, acetone, ethanol, separated from biomass by centrifugation was introduced hypercrosslinked polystyrene sorbent MN202 («Purolite») in the ratio LF: sorbent = 10:1. Sorption process was stimulated by ultrasound (US) with a frequency of 22 kHz, at an acoustic power density of 0.5 W / cm^3 for 60 seconds. Sorbent was separated from the liquid and the content butanol, acetone and ethanol in permeate was determined by gas-liquid chromatography. Degree of extraction of butanol from LF using sorbent in combination with ultrasound, reached 80%. The use of ultrasound can significantly (from 3 - 4 hours to 1 minute) reduce the time of sorbent saturation, simplify the process, reduce energy consumption, and to combine this process with the fermentation process.

УДК 579.66

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В КАЧЕСТВЕ ЖИВЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ

Розанов А.С., Пельтек С.Е.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, ул. пр-т Академика Лаврентьева, д.10
e-mail: sibiryak.n@gmail.com

Использование термофилов в микробиальных процессах в настоящее время мало распространено. Использование высоких температур позволит создать технологии прямой конверсии растительных полимеров, в первую очередь крахмала. Кроме этого использование высоких температур имеет потенциал для

увеличения эффективности существующих процессов.

Ключевые слова: Термофилы, биотехнология, деструкция растительных биополимеров, крахмал.

Использование термофильных микроорганизмов для микробиального синтеза в настоящее время не очень распространено, но имеет значительные перспективы для повышения эффективности технологических процессов. Использование повышенных температур имеет хорошо обсужденные преимущества: - снижение вероятности контаминации; - снижение вязкости концентрированных жидкостей; - высокопотенциальное тепло; - и снижение амплитуды температурных колебаний в цепи технологических процессов. Но наиболее интересны термофилы для использования в следующих ключевых моментах. Первый, это прямая деструкция растительных биополимеров крахмала, и компоненты лигноцеллюлозной биомассы. Деструкция биополимеров требует использования высоких температур и отдельной стадии. Связано это с тем, что растительные биополимеры и в первую очередь крахмал труднодоступны для ферментов при нормальной температуре. При повышении температуры происходит желатинизация крахмала в результате чего он становится доступен для ферментативного гидролиза. Процесса прямой конверсии крахмала микроорганизмами в настоящее время не существует, из-за того, что микроорганизмы разрушают его очень медленно. Это не выгодно экономически. Использование термофилов позволит проводить прямую конверсию крахмала до конечного продукта так как при повышенных температурах ферменты микроорганизмов будут способны эффективно его гидролизовать. Аналогичная ситуация возникает при гидролизе растительной биомассы. Перспективы ее использования в микробиальном синтезе туманны, но если будет создана технология ее прямой конверсии, то это будет способствовать дальнейшему продвижению идеи использования растительной биомассы в микробиальном синтезе. И ключевую роль в этом процессе могут сыграть термофилы или полиэкстремофилы, так-как доступность целлюлозы будет выше при экстремальных значениях температуры, давления и pH. Второй момент, это использование природного газа метанотрофами для микробиального синтеза. Этот процесс идет с выделением огромного количества тепла. Это тепло будет значительно проще отводить если процесс будет происходить при более высоких температурах.

UDC 579.66

PROSPECTS FOR THE USE OF THERMOPHILIC BACTERIA AS LIVING CATALYSTS

Rozanov A.S., Peltek S.E.

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)
Prospekt Lavrentyeva 10, Novosibirsk, Russia, 630090
e-mail: sibiryak.n@gmail.com

Currently use of thermophiles in the microbial processes little widespread. Using high temperature technology will create a direct conversion of plant polymers, especially starch. Furthermore, the use of high temperatures has the potential to increase the effectiveness of existing processes.

Keywords: thermophiles, biotechnology, destruction of plant biopolymers, starch.

The use of thermophilic microorganisms for microbial synthesis is currently not very common, but it has considerable promise for improving process efficiency. The use of higher temperatures has a good discussed advantages: - reduce the likelihood of contamination; - reducing the viscosity of concentrated liquids; - high-potential heat; - reduction of the amplitude of the temperature oscillations in the chain of processes. But the most interesting thermophiles for the following key points. The first is the direct destruction of plant biopolymers starch and lignocellulosic biomass components. Biopolymers destruction requires high temperatures and a separate step. This is because plant biopolymers and primarily starch are difficult for enzymes at normal temperature. With increasing temperature, the starch gelatinization whereby it becomes accessible for enzymatic hydrolysis. Direct conversion of starch process by microorganisms is not currently exist, because it destroys by microorganisms are very slow. It is not profitable. Using thermophiles will allow for the direct conversion of starch to the final product because at higher temperatures microbial enzymes are capable of efficiently hydrolyze it. A similar situation occurs in the hydrolysis of plant biomass. Prospects for its use in the synthesis of microbial nebulous, but if a direct conversion technology will create, it will help to further promote the use of plant biomass in the microbial synthesis. And the key role in this process may play thermophiles or poliextremofiles, so as cellulose availability is higher in extreme temperature, pressure and pH. The second point is the use of natural gas methanotrophs for microbial synthesis. This process is going to release a huge amount of heat. This heat will be much easier deducев at higher temperatures.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ В БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Кудынюк О.С., Jürgen Grebe

ООО «МИЛЛАБ», Москва, Россия 127410, Москва, Инженерная ул., 18
e-mail: olk@millab.ru

Рассмотрены технологии оптимизации процесса лиофилизации на разных его этапах – замораживание, основная сушка и финальная сушка. Показаны возможности применения данных технологий на пилотном и промышленном оборудовании.

Ключевые слова: лиофилизация; температура стеклования; контролируемая кристаллизация; оптимизация.

Приведены основные параметры процесса, которые подвергаются оптимизации для обеспечения качества продукта и сокращения общего времени цикла лиофилизации. В докладе рассматриваются технологии оптимизации процесса лиофилизации на различных стадиях процесса, а именно: технология контролируемой кристаллизации для оптимизации кристаллической структуры замороженного продукта; технология определения точки эвтектики и температуры стеклования продукта с помощью одновременного измерения температуры и электрического сопротивления продукта; технология определения температуры коллапса для продуктов с аморфной структурой; технология оценки скорости лиофилизации на основном и финальном этапах сушки с помощью системы взвешивания образца в режиме «реального времени»; технология оценки остаточной влажности высушенного продукта; технологии определения завершения основного этапа лиофилизации; технология беспроводного измерения температуры образцов для получения максимально точных результатов.

Литература:
1. *Bockelmann, Wilhelm Gefriertrocknung und Lagerung von Mikroorganismen. Christ-Gefriertrocknungsseminar, 3rd–4th of March 2009, Osterode*
2. *Gieseler, H.; Lee, G. Influence of Different Cooling Rate on Cake Structure of Freeze Dried Samples Measured by Microbalance Technique. Poster presentation, Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, München (2003).*
3. *Gieseler, Henning Gefriertrocknung von Pharmazeutika –Grundlagen der Formulierungs- und Prozessentwicklung. Christ-Gefriertrocknungsseminar, 25th of June 2003.*
4. *Searls, J.; Carpenter, J.; Randolph, T. Annealing to Optimize the Primary Drying Rate, Reduce Freeze-Induced Drying Rate Heterogeneity, and Determine Tg' in Pharmaceutical Lyophilisation, J. Pharm. Sci., Vol. 90, Nr. 7, 872–887 (2001).*
5. *Lyophilization of Vaccines. Current Trends. Gerald D. J. Adams. Methods in Molecular Medicine, Vol. 87: Vaccine Protocols, 2nd ed.*
6. *Diverse Lyotrack presentation for freeze drying, given at company Martin Christ, Alcatel / Adixen 8 / 2006.*
7. *Roth, C.; Winter, G.; Lee, G.; Continuous Measurement of Drying Rate of Crystalline and Amorphous Systems during Freeze-Drying Using an In Situ Microbalance Technique. J. Pharm. Sci., Vol. 90, No. 9, 1345–1355 (2001).*

OPTIMIZATION OF LYOPHILIZATION IN BIOPHARMACEUTIACAL INDUSTRY

Kudyniuk O., Jürgen Grebe

OOO MILLAB, Moscow, Russia 127410, Moscow, Inzhenernaja str., 18
e-mail: olk@millab.ru

Review of technologies for optimization of all steps of lyophilization – freezing, main drying and second drying. The possibility to utilize them on pilot and production scale freeze dryers.

Key words: lyophilization; glass transition temperature; controlled nucleation; optimization.

The process parameters that undergo to optimization to ensure quality of final product and reduce total time of lyophilization cycle have been shown. Variety of technologies for lyophilisation optimization has been

reviewed, such as controlled nucleation technology for structure optimization of frozen product; technology for determination of eutectic point or glass transition temperature by simultaneous measuring of impedance and product temperature; technology for determination of collapse temperature for product with amorphous structure; technology for estimation of drying rate for main and second lyophilization steps by weighing of sample in real time mode; technologies for determination of the end of main drying; technology of wireless measurement of product temperature.

References:
1. *Bockelmann, Wilhelm Gefriertrocknung und Lagerung von Mikroorganismen. Christ-Gefriertrocknungsseminar, 3rd–4th of March 2009, Osterode*
2. *Gieseler, H.; Lee, G. Influence of Different Cooling Rate on Cake Structure of Freeze Dried Samples Measured by Microbalance Technique. Poster presentation, Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, München (2003).*
3. *Gieseler, Henning Gefriertrocknung von Pharmazeutika –Grundlagen der Formulierungs- und Prozessentwicklung. Christ-Gefriertrocknungsseminar, 25th of June 2003.*
4. *Searls, J.; Carpenter, J.; Randolph, T. Annealing to Optimize the Primary Drying Rate, Reduce Freeze-Induced Drying Rate Heterogeneity, and Determine Tg' in Pharmaceutical Lyophilisation, J. Pharm. Sci., Vol. 90, Nr. 7, 872–887 (2001).*
5. *Lyophilization of Vaccines. Current Trends. Gerald D. J. Adams. Methods in Molecular Medicine, Vol. 87: Vaccine Protocols, 2nd ed.*
6. *Diverse Lyotrack presentation for freeze drying, given at company Martin Christ, Alcatel / Adixen 8 / 2006.*
7. *Roth, C.; Winter, G.; Lee, G.; Continuous Measurement of Drying Rate of Crystalline and Amorphous Systems during Freeze-Drying Using an In Situ Microbalance Technique. J. Pharm. Sci., Vol. 90, No. 9, 1345–1355 (2001).*

УДК 544.726.2

СОЗДАНИЕ ФАРМКОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ СОРБЦИОННОГО НОСИТЕЛЯ И РАЗЛИЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Омельянова А.П., Глазова Н.В.

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197376, г.Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит.А
e-mail: alexandra.omelyanova@pharminnotech.com

Были изучены сорбционные свойства ферментов: протеазы и амилазы. Подобран оптимальный для фармкомпозиции носитель. Проведено сравнение полученного комплекса ферменты-носитель с актуальными препаратами системной энзимотерапии.

Ключевые слова: сорбенты, ферменты, сорбция, фармкомпозиция, СЭТ.

Заболевания органов пищеварительной системы на сегодня по данным Минздравсоцразвития России стоят на третьем месте в общей структуре заболеваемости населения страны [1]. Немалая часть этих заболеваний носит характер ферментной недостаточности. В качестве лечения в таких случаях использую СЭТ – системную энзимотерапию. Она заключается в комплексном воздействии целенаправленно составленных смесей протеолитических ферментов (энзимов) на весь организм в целом. Препараты СЭТ представлены в России немецкой фирмой «Mucos Farma» и выпускаются в виде таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, предохраняющей ферменты от воздействия желудочного сока [2]. Такая лекарственная форма обладает недостатками, которые затрудняют ее применение в отношении пациентов пожилого возраста и детей. Поэтому актуальной задачей данной работы является создание эффективного средства для применения в гастроэнтерологической терапии в виде порошка, быстрораспадающейся таблетки или суспензии с сохранением кислотостойкости ферментов, входящих в данное лекарственное средство.

В качестве объектов исследования выступали ферменты протеаза и амилаза. Для получения эффективной фармкомпозиции были изучены характеристики сорбции ферментов на сорбентах и подобран оптимальный мелкодисперсный носитель, на котором были иммобилизованы представленные ферменты. Так же было проведено сравнение кислотостойкости полученного комплекса ферментов на мелкодис-

персном носителе и ферментных препаратов, использующихся в системной энзимотерапии. Показано, что комплекс ферментов на подобранном носителе не уступает по кислостойкости зарубежным препаратам, что в сочетании с его формой дает возможность использовать его в получении эффективной фармкомпозиции для использования в СЭТ.

Литература:
1. *Житникова Л.М. Нарушения пищеварения и значение ферментотерапии в общей медицинской практике // РМЖ – 2011 – №28 – С. 1722*
2. *Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента: системная энзимотерапия. http://www.rlsnet.ru/books_book_id_2_page_220.htm (дата обращения: 03.12.2016)*

UDC 544.726.2

CREATION OF PHARMACEUTICAL COMPOSITION BASED ON SORBENT AGENT AND VARIOUS ENZYMES

Omelyanova A.P., Glazova N.V.

Federal State Educational Institution of Higher Education «Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy» of the Russian Federation Ministry of Health, St.-Petersburg, Russia
197376, St. Petersburg, ul. Professora Popova, d. 14, lit.A
e-mail: alexandra.omelyanova@pharminnotech.com

Sorption properties of enzymes (protease and amylase) were studied. The carrier, optimum for pharmaceutical composition, was picked up. Comparison of the received complex enzymes/carrier with topical preparations of systemic enzyme therapy was carried out.

Keywords: sorbents, enzymes, sorption, pharmaceutical composition, SET.

According to the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation diseases of organs of the digestive system are on the third place in the general structure of incidence of the population of the country for today [1]. Considerable part of these diseases is characterized by enzymatic deficiency. As treatment in such cases use SET - systemic enzyme therapy. It involves the integrated systemic action of proteolytic enzymes combinations on organism. SET substances are represented in Russia by the German company «Mucos Farma» and issued in the form of tablets, enteric-coated, which protects the enzymes from the effects of gastric juice [2]. This dosage form has disadvantages that hinder its application to elderly patients and children. Therefore an urgent task of this work is creation of an effective composition with application in gastroenterological therapy in the form of powder, the quick-breaking tablets or suspension with preservation of acid resistance of integrated enzymes.

The objects of the study were enzymes: protease and amylase. For creation of effective pharmaceutical composition sorption characteristics of enzymes were studied on some sorbents and the optimum carrier on which the provided enzymes were immobilized was picked up. Comparison of acid resistance of the received complex of enzymes on carrier and enzyme preparations used in systemic enzyme therapy has been carried out. It has been that the complex of enzymes on the picked-up sorbent is equals or betters on acid resistance then foreign preparations that in combination with its form makes possible to use it to obtain effective pharmaceutical composition for SET.

References:
1. *ZHitnikova L.M. Narusheniya pishchevareniya i znachenie fermentoterapii v obshchej medicinskoj praktike // RMZH – 2011 – №28 – S. 1722*
2. *Enciklopediya lekarstv i tovarov aptechnogo assortimenta: sistemnaya enzimoterapiya. http://www.rlsnet.ru/books_book_id_2_page_220.htm (data obrashcheniya: 03.12.2016)*

УДК 658.5+338.43

ОСОБЕННОСТИ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕДПРИЯТИЯ ПО ПРОИЗВОДСТВУ СПИРУЛИНЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Ефимов Ю. С., Кирюшин П. А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Москва, Россия
119234, Ленинские Горы ул., 1, стр. 46, Москва
e-mail: yyy.efimov@gmail.com

Рассмотрены ключевые моменты создания биотехнологического предприятия по производству сине-зеленой водоросли спирулины в крупном или среднем масштабе с учетом возможностей программы «БИО-2020».

Ключевые слова: спирулина, промышленные биотехнологии, БИО-2020, инновационное производство, маркетинг.

На сегодняшний день биотехнологии являются одним из важнейших направлений инновационного развития экономики, как в мире, так и в России. Несмотря на то, что в последние годы доля рынка биотехнологических продуктов в России была достаточно мала, согласно государственной программе «БИО-2020» планируется вывести этот показатель до 1% ВВП к 2020 году и до 3% ВВП к 2030 году. Помочь этому может создание инновационных предприятий среднего и крупного масштаба на территории России.

Одним из подобных примеров может являться создание предприятия по производству биодобавок из сине-зеленой водоросли Arthrospira Planetsis, иначе - спирулины, а также различных продуктов с её использованием. Непосредственно спирулина является ценным биотехнологическим продуктом - исследованию этой микроводоросли посвящено большое количество работ, отмечающих в качестве положительных сторон: большой процент легкоусвояемого белка (до 70% при пересчете на сухой вес), содержание ряда микроэлементов в органической форме, большого числа различных витаминов, и т.д. Сегодня большая часть спирулины производится в США, Индии и Китае, в России же объем производства спирулины сравнительно мал. На территории нашей страны уже действует ряд небольших компаний по производству биодобавок из спирулины, но масштаб их невелик, более того - ряд производителей предпочитает выращиванию спирулины закупку её за границей. Таким образом стоит задача создания крупного предприятия на территории России, включающего все этапы производства - от получения сырья до реализации готового продукта дилеру или конечному потребителю.

Более того, ассортимент имеющихся на сегодняшний день продуктов из спирулины довольно мал - их не найдешь на полках супермаркетов, в отличие от ряда магазинов, например, в США - где многие осведомлены о пользе продуктов со спирулиной и могут быстро приобрести их. Тем самым для подобного предприятия ставится ещё одна цель - проведение грамотной маркетинговой кампании, что приведет к стимулированию спроса и потенциальной возможности для увеличения объема производства.

Предприятие также должно иметь в своем составе эффективный департамент R&D, который будет работать над улучшением ассортимента. Например, известно, что меняя условия выращивания спирулины, можно добиться повышения содержания в ней определенных микроэлементов, что позволит рекомендовать такой продукт в качестве биологически-активной добавки для людей, страдающих от нехватки конкретных микроэлементов. Подобный подход открывает широкий ряд возможностей получения лекарств из спирулины для фармацевтической отрасли.

Подготовлено при поддержке проекта РГНФ № 16-02-00299 «Разработка методологии и инструментария оценки динамики перехода Российской Федерации к «зеленой» экономике».

UDK 658.5+338.43

FEATURES OF BIOTECHNOLOGICAL ENTERPRISE CREATION OF SPIRULINA PRODUCTION IN RUSSIA

Efimov Yu. S., Kiryushin P. A.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119234, Leninskie Gory st., 1, bld. 46, Moscow
e-mail: yyy.efimov@gmail.com

Key moments of biotechnological enterprise creation of blue-green algae Spirulina in medium or large scale taking into account possibilities of “BIO-2020” program were examined.

Key words: spirulina, industrial biotechnology, BIO-2020, innovative production, marketing.

Today one may see biotechnology as the one of the most important branches of innovative economy development in the world as well as in Russia. Despite the fact, biotechnological market share in last years in Russia was relatively small, according to government program “BIO-2020” it is planned to reach 1% of GDP in 2020 and 3% of GRP in 2030 of biotechnological market share. Creation of innovative enterprises of medium or large scale in Russia can help to reach these numbers.

One of examples of such kind is enterprise creation of blue-green algae Arthrospira Planetsis (better known as Spirulina), as well as different products with Spirulina. Spirulina is known as valuable biotechnological product with an array of possible applications. Many studies confirms its value, providing such positive qualities of Spirulina as large amount of easily digestible protein (up to 70% of dry weight), many different microelements as the part of organic biomass, many vitamins, and so on. Today the production of Spirulina is mostly situated in such countries as China, India and USA. There is also production in Russia, but the scale is very small compared to other countries, moreover, many producers prefer to buy biomass abroad. So to sum it up the opportunity of biotechnological enterprise creation of Spirulina production in Russia having into control all parts of the process – from growing raw materials to product realization is an important task.

Furthermore, the assortment of Spirulina products in Russia is quite small - hardly one can find food with Spirulina is usual grocery, compared, for example, to USA, where many people know about beneficial qualities of Spirulina products and use it regularly. Thus, for such an enterprise there is another goal to achieve - carrying out competent marketing campaign, which will stimulate demand and will create more possibilities for further increasing production.

Lastly, such enterprise also has to have an effective R & D department, which will work to improve assortment of products. For example, it is known that by changing the conditions of cultivation of Spirulina, you can improve the content of certain microelements in it, so it will be possible to recommend this product as dietary supplements for people suffering from a lack of specific micronutrients. This approach also opens up a wide range of possibilities of obtaining drugs from Spirulina for the pharmaceutical industry.

Written with the support of RHF number 16-02-00299 «Development of methodology and tools for the Russian Federation to assess the dynamics of the transition of «green» economics».

БИОИНФОРМАТИКА И IT
BIOINFORMATICS AND IT

СЕКЦИЯ
БИОИНФОРМАТИКА И IT

SECTION
BIOINFORMATICS AND IT

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 577.21

ВАРИАНТЫ В РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНОВ ВЛИЯЮЩИЕ НА СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ТРАНСКРИПЦИЮ

Ландо А.С.[1,2], Воронцов И.Е.[1], Кулаковс кий И.В.[1,3], Макеев В.Ю.[1,2,3]

[1] Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3, e-mail: vsevolod.makeev@vigg.ru
[2] Московский физико-технический институт, Московская область, Россия
[3] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32

Разработаны методы, позволяющие осуществлять предсказание in silico участков ДНК, связывающих факторы регуляции транскрипции в конкретной ткани. При этом не используется прямая информации о связывании белка в данной ткани: предсказания делаются на основании экспериментов, характеризущих ткань в целом (экспрессия генов и структура хроматина), и экспериментов характеризующих специфику связывания белка.

Ключевые слова: полиморфизм, ДНК-белковое взаимодействие, регуляция транскрипции, структура хроматина, экспрессия гена.

Современные высокопроизводительные методы позволяют идентифицировать однонуклеотидные полиморфизмы и соматические мутации в масштабе полных геномов. Недавние исследования показали, что от 60 до 90% нуклеотидных замен, ассоциированных с заболеваниями, встречаются в некодирующей ДНК, преимущественно в регуляторных районах. Одним из предполагаемых механизмов возникновения таких ассоциаций является модификация участков ДНК, специфически связывающиеся факторы транскрипции, что в свою очередь может привести к изменениям в экспрессии регулируемых генов. Эти изменения экспрессии сильно зависят от конкретной ткани, поскольку мутация или аллельный вариант в конкретной ткани может оказать в открытом или закрытом сегменте хроматина, а также в присутствии или в отсутствие тканеспецифически связанных кофакторов. Важный вопрос заключается в том, насколько в настоящее время возможна идентификация ткани, в которой конкретный полиморфизм или соматическая мутация влияет на экспрессию генов и клеточный фенотип. Мы показываем, что для относительно большого набора транскрипционных факторов существующие методы обеспечивают достаточно надежное и точное предсказание участков ДНК, связывающих эти факторы в конкретной ткани, при условии доступности данных по статусу хроматина и картины тканеспецифической экспрессии генов. Для увели-

БИОИНФОРМАТИКА И IT

чения точности предсказания, во многих случаях предсказания могут быть перенесны из других тканей, в которых выполнены эксперименты ChIP-seq. Анализируются условия, при которых возможны такие предсказания.

UDC 577.21

VARIATIONS IN REGULATORY REGIONS AFFECTING BINDING OF PROTEINS INVOLVED INTO REGULATION OF TISSUE-SPECIFIC GENE EXPRESSION

Lando A.S. [1,2],Vorontsov I.E.[1], Kulakovskiy I.V.,[1,3] Makeev V.J.[1,2,3]

[1] Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[2] Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia
[3] Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

We present a method allowing *in silico* identifying of DNA-sites at transcription regulators are bound in particular cell types. Our approach does not require direct information on protein binding in the test cell-type. Instead we use information characterising the cell type (chromatin status and gene expression), and protein binding specificity obtained in different *in vivo* and in *vitro* experiments.

Key words: polymorphism, DNA-protein interaction, transcription regulation, chromatin structure, gene expression.

High throughput technologies allow researchers to identify single-nucleotide polymorphisms and somatic mutations. Recent association studies demonstrated that from 60 to 90% of nucleotide substitution associated with deceases are found in non-coding, predominantly regulatory regions of the genomes. One of putative mechanisms of such associations is modification of protein binding properties of regulatory DNA with emerging or disrupting motifs specifically binding transcription factors. The changes in gene expression associated with nucleotide substitutions are highly dependent on the cell type because a mutation or allele variant can be found in the open or closed chromatin as well as in the presence or absence of tissue-specific co-factors binding nearby. We developed a method that can reliable predict cell types in which a nucleotide substitution can affect gene expression; the important feature of the method is that it does not require cell-type specific protein binding profile, but is based on separate assessment of cell-type characteristics like chromatin binding profile or gene expression and protein binding specificity, which can be obtained in vitro or in other cell types. To increase binding site prediction power result on binding profiles in other cell types can be used, we discussed when and how these results can be transited to the target cell type.

УДК 573.22

АНАЛИЗ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕННЫХ СЕТЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММЫ ORTHOSCAPE

Лашин С.А., Мустафин З.С., Матушкин Ю.Г., Гунбин К.В., Афонников Д.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 10
e-mail: lashin@bionet.nsc.ru

Программная платформа Cytoscape является одним из наиболее популярных средств для исследования сетей. Мы представляем Cytoscape-приложение Orthoscape, предназначенное для анализа эволюционных характеристик генных сетей, а также результаты такого анализа на примере нескольких генных сетей человека.
Ключевые слова: генные сети, эволюция, Cytoscape, возраст гена, ортолог, паралог, дивергенция.

Несмотря на большое количество плагинов и приложений Cytoscape, разработанных для анализа биологических сетей разных типов (генные сети, сети белок-белковых взаимодействий и др.), среди них до практически нет таковых предназначенных для исследования эволюционных аспектов биологических сетей. Нами разработан программный комплекс (приложение Cytoscape) Orthoscape, предназна-

BIOINFORMATICS AND IT

ченный для анализа эволюционных характеристик генных сетей. Графический интерфейс Orthoscape позволяет раскрашивать обозначения генов в сетях, группировать гены в кластеры, а также перекомпоновывать гены на плоскости согласно их эволюционным свойствам. Использование программы позволяет определять эволюционные особенности как отдельных генов, так и сети в целом, определять узкие места сети, а также сравнивать разные сети между собой, используя различные эволюционные индексы, такие как индекс филостратиграфического возраста (phylostratigraphic age index – PAI) сети и индекс дивергенции (divergence index – DI или Ka/Ks index) сети. С помощью Orthoscape проведён сравнительный анализ ряда метаболических путей и путей передачи сигналов из базы данных KEGG. В частности, был проведён сравнительный анализ путей биосинтеза стероидов и биосинтеза стероидных гормонов. Для генов пути биосинтеза стероидных гормонов характерны большие значения PAI (т.е. меньший «эволюционный возраст»), чем для генов пути биосинтеза стероидов. Это согласуется с данными о большей вариабельности функций гормонов (регуляция ответа на внешнюю среду), их биосинтезом в специфических органах, в сравнении с повсеместным синтезом стероидов – основных компонент клеточных мембран.

UDC 573.22

ANALYSIS OF EVOLUTIONARY CHARACTERISTICS OF GENE NETWORKS WITH THE USE OF ORTHOSCAPE SOFTWARE

Lashin S.A., Mustafin Z.S., Matushkin Yu.G., Gunbin K.V., Afonnikov D.A.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave. 10
e-mail: lashin@bionet.nsc.ru

Cytoscape software platform is one of the most popular tools for network analysis. We present a novel Cytoscape application called Orthoscape developed for the analysis of evolutionary characteristics of gene networks. We also present a case study on the analysis gene networks related to steroid metabolism: steroid biosynthesis pathway and steroid hormone biosynthesis pathway in human.

Key words: gene networks, evolution, Cytoscape, gene age, ortholog, paralog, divergence.

In spite of the large number of Cytoscape plugins and applications designed for analysis of biological networks of various types (gene regulatory networks, protein-protein interaction networks, etc.), there is still a lack of ones intended to study of evolutionary aspects of biological networks. We have developed a Cytoscape application called Orthoscape to provide the analysis of evolutionary characteristics of gene networks. Graphical user interface of the Orthoscape allows users to paint genes in networks, group them into clusters, and layout them according to their evolutionary features. The program calculates evolutionary characteristics of both separate genes and the entire gene networks. It defines network bottlenecks and provides comparison of networks according to various evolutionary indices such as phylostratigraphic 'age' index (PAI) and divergence index (DI or Ka/Ks index). Using the Orthoscape, we have provided comparative analysis of several metabolic pathways and signal transduction pathways taken from the KEGG database. In particular, have done the comparative analysis of steroid biosynthesis pathway and steroid hormone biosynthesis pathway. The genes of the second pathway tend to have larger PAI (i.e. they are evolutionary younger) than the genes of the first pathway. The obtained results are consistent with the current knowledge of the eukaryotic evolution. Steroid hormones have more variable functions as they regulate responses on environmental changes and may be differentially expressed in different organs, while steroids participate in the formation of membranes, which are basal cellular structures in eukaryotes.

БИОИНФОРМАТИКА И IT

УДК 577.212

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО МАТЕМАТИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МНОЖЕСТВЕННОГО ВЫРАВНИВАНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ ПОИСКА ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ C.ELEGANS.

Коротков Е.В, Пугачева В.М.

Институт Биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
119071, Москва, Россия, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
e-mail: bioinf@yandex.ru

Разработан новый математический метод для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей. Метод применен для поиска тандемных повторов в геноме C.elegans с учетом вставок или делеций нуклеотидов. Показано, что повторяющиеся последовательности занимают примерно оклоло 10% генома C.elegans.

Ключевые слова: случайные матрицы, динамическое программирование, геном, C.elegans

В условиях больших успехов по секвенированию разнообразных геномов и нарастающего накопления информации о полных геномах многих видов особое значение приобретает разработка и применение математических методов для изучения аминокислотных и нуклеотидных последовательностей. Без этих методов большая часть известных последовательностей оснований ДНК хранится в компьютерных банках данных без существенного использования. Особенно это касается геномов эукариот. Задачей при развитии новых математических методов является нахождение новых математических закономерностей организации нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и связь этих закономерностей с известными биологическими функциями. Таким образом, разработка новых математических методов позволяет сделать структурную аннотацию тех участков геномов и аминокислотных последовательностей, которые в настоящее время никак не охарактеризованы. Эти же исследования позволяют затем связать те или иные структурные закономерности строения последовательностей с их биологическими свойствами. В результате таких исследований развиваются новые методы структурной и функциональной аннотации нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. В данной работе разработан новый математический метод для поиска тандемных повторов в последовательности ДНК. Метод основан на определении множественного выравнивания отдельных периодов как единого целого. Метод использует прямую оптимизацию позиционно-весовых матриц (ПВМ) без использования парных выравниваний периодов или без поиска сходства между периодами. Это позволяет обнаруживать на статистически значимом уровне такие множественные выравнивания, которые пропускаются всеми известными на сегодняшний день алгоритмами. Случайные ПВМ были использованы для разработки нового математического алгоритма для поиска периодичности. Выбиралась наилучшая ПВМ, которая была затем оптимизирована при помощи генетического алгоритма [Pugacheva V.M., Korotkov A.E, Korotkov E.V., 2016; Pugacheva, V., Korotkov, A. and Korotkov, 2016]. Разработанный алгоритм был применен для анализа последовательностей ДНК генома C.elegans. Было найдено 25360 последовательностей, имеющих периодичность с длиной от 2 до 50 оснований ДНК. Ранее разработанные методы не обнаружили периодичности в более 70% выявленных нами районов В среднем один район с периодичностью приходится на ~4000 нуклеотидов и распределение периодичности по длине хромосомы связано со структурой центромеры. Значительная часть выявленных последовательностей содержит периоды равные 10 и 11 нуклеотидам, периоды кратные 10 нуклеотидам и период, равный 35 нуклеотидам. В этом исследовании рассматриваются биологическое значение обнаруженной периодичности.

Литература:

1. *Pugacheva V.M., Korotkov A.E, Korotkov E.V. Search of latent periodicity in amino acid sequences by means of genetic algorithm and dynamic programming // Stat. Appl. Genet. Mol. Biol. 2016. Т. 15. № 4.*
2. *Pugacheva, V., Korotkov, A. and Korotkov E. Search for Latent Periodicity in Amino Acid Sequences with Insertions and Deletions // Proceedings of the 9th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2016). : SCITEPRESS – Science and Technology Publications, Lda., 2016. С. 117–127.*

BIOINFORMATICS AND IT

UDC 577.212

USING OF THE NEW MATHEMATICAL METHOD FOR SEARCH OF A MULTI ALIGNMENT FOR SEARCH OF REGIONS WITH PERIODICITY IN THE GENOME OF *C. ELEGANS*

Korotkov E.V., Pugacheva V.M.

Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky Ave. 33, bld. 2, 119071, Moscow, Russia.
e-mail: genekorotkov@gmail.com

A new mathematical method for multiple alignment of nucleotide sequences was developed. The method is applied to find the tandem repeats with insertions and deletions of nucleotides in the genome of C.elegans. It was shown that repetitive sequences occupy approximately 10% C.elegans genome.

Key words: random matrix, dynamic programming, gene, C.elegans

The great advance that has occurred in the sequencing of manifold genomes and the ever- increasing volume of the data on the full genomes of many species make the development of mathematical methods for analyzing amino acid and nucleotide sequences and their use especially important. Without such methods, most of the known sequences of DNA bases are simply stored in computer data banks and are almost not utilized. This is especially true for eukaryotic genomes. One of the goals when developing new mathematical methods is to search for new mathematical patterns in the arrangement of nucleotide and amino acid sequences and to determine how these patterns are associated with known biological functions. Thus, the development of new mathematical methods allows for structural annotation of the genome regions and amino acid sequences that have not been characterized thus far. The same studies then make it possible to connect particular structural patterns in sequence arrangement with their biological properties. Such studies contribute to the development of new methods for the structural andfunctional annotation of nucleotide and amino acid sequences. A mathematical method was developed in this study to determine tandem repeats in a DNA sequence. A multiple alignment of periods was calculated by direct optimization of the position-weight matrix (PWM) without using pairwise alignments or searching for similarity between periods. Random PWMs were used to develop a new mathematical algorithm for periodicity search. Genetic algorithm was used for PWM optimization [Pugacheva V.M., Korotkov A.E, Korotkov E.V., 2016; Pugacheva, V., Korotkov, A. and Korotkov, 2016]. The developed algorithm was applied to analyze the DNA sequences of C.elegans genome. 25360 regions having a periodicity with length of 2 to 50 bases were found. On the average, a periodicity of ~4000 nucleotides was found to be associated with each region. A significant portion of the revealed regions have periods consisting of 10 and 11 nucleotides, multiple to 10 nucleotides and periods in the vicinity of 35 nucleotides. Only ~30% of the periods found were discovered early. The origin of periodicity with insertions and deletions is discussed in this study.

References:

1. *Pugacheva V.M., Korotkov A.E, Korotkov E.V. Search of latent periodicity in amino acid sequences by means of genetic algorithm and dynamic programming // Stat. Appl. Genet. Mol. Biol. 2016. T. 15. № 4.*
2. *Pugacheva, V., Korotkov, A. and Korotkov E. Search for Latent Periodicity in Amino Acid Sequences with Insertions and Deletions // Proceedings of the 9th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2016). : SCITEPRESS – Science and Technology Publications, Lda., 2016. C. 117–127.*

УДК 544.165

ПОДХОД К РЕПОЗИЦИОНИРОВАНИЮ ЛЕКАРСТВ, ОСНОВАННЫЙ НА СТРУКТУРЕ ЛИГАНДОВ, НА ПЛАТФОРМЕ WAY2DRUG

Дружиловский Д.С., Рудик А.В., Филимонов Д.А., Поройков В.В.

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

Разработана пилотная версия веб-платформы Way2Drug для компьютерной оценки широкого спектра характеристик, разрешенных к медицинскому применению лекарств и фармакологически активных веществ.

Ключевые слова: репозиционирование лекарств, химико-биологические взаимодействия; биоинформатика; подходы, основанные на структуре лигандов; веб-платформа Way2Drug

Недостаток фундаментальных знаний о молекулярных механизмах и нарушениях различных регуляторных путей, связанных с развитием заболевания, приводит к неполноте информации о химико-биологических взаимодействиях, создаваемых и применяемых в медицинской практике лекарственных препаратов. Компьютерные подходы, основанные на структуре лигандов (Ligand-Based-Drug Design) позволяют, на основе анализа взаимосвязей «структура-свойства», прогнозировать новые виды биологической активности для разрешенных к медицинскому применению лекарств и изучаемых экспериментально фармакологических веществ.

Целью нашей работы является разработка эффективных компьютерных методов для поиска наиболее перспективных фармакологических мишеней, поиска и конструирования их лигандов, а также интеграция разработанных методов в единую вычислительную платформу Way2Drug (http://www.way2drug.com/dr/). Валидацию разработанных методов планируется осуществить на примере поиска новых препаратов для терапии как неинфекционных заболеваний (диабет, злокачественные новообразования, эпилепсия), так и инфекционных заболеваний (туберкулез, малярия, лейшманиоз, шистосомоз).

В настоящее время для зарегистрированных пользователей обеспечен доступ к: базе данных по лекарственным препаратам, зарегистрированных U.S. Food and Drug Administration; базе данных по более чем 1400 субстанций лекарственных препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации; базе знаний по лекарственным мишеням, воздействие на которые используется/изучается для терапии онкологических заболеваний, диабета, туберкулеза и др. Реализованы гипертекстовые ссылки, обеспечивающие связи между более чем 1200 фармакологическими мишенями, воздействие на которые прогнозируется программой PASS Online, с базами данных UniProt, KEGG, PDB. Создано программное обеспечение SAR Creator, которое позволяет создавать online обучающие выборки для построения (Q)SAR моделей. Разработанные нами веб сервисы обеспечивают прогноз взаимодействий с ~80% молекулярных мишеней, которые изучаются в целевой фармакотерапевтической области.

UDC 544.165

LIGAND-BASED APPROACH TO DRUG REPURPOSING AT THE WAY2DRUG PLATFORM

Druzhilovskiy D.S., Rudik A.V., Filimonov D.A., Poroikov V.V.

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russian Federation
119121, Moscow, Russia, Pogodinskaya Street, 10, building 8
e-mail: dmitry.druzhilovsky@ibmc.msk.ru

A pilot version of Way2Drug web platform is developed, that provided computational evaluation of a wide range of characteristics for the approved drugs and pharmacological substances.

Key words: drug repurposing, ligand-based approach, chemical-biological interactions, systems biomedicine, multi-target action, web platform Way2Drug.

A lack of substantive knowledge of the molecular mechanisms and disruptions of various regulatory pathways associated with particular disease lead to incomplete information of chemical-biological interactions of therapeutic drugs, which are developed and applicable in medical praxis. Computational ligand-based drug design based on the analysis of structure-property relationships that predicts new kinds of biological activity for medicines used for therapeutic purposes and experimentally investigated pharmaceutical agents.

The aim of this project is to develop the efficient computational methods for identifying the promising pharmacological targets, for searching and designing their ligands, and the integration of the established computational approaches into a unified platform Way2Drug (http://www.way2drug.com/dr/). Validation of the developed methods is planned to be implemented by discovering new medicines for the treatment of both

BIOINFORMATICS AND IT

non-infectious (diabetes, cancer, CNS disorders) and infectious diseases (tuberculosis, malaria, leishmaniasis, schistosomiasis).

At present, some databases were made available for use by registered users: database of medicines approved by the U.S. Food and Drug Administration; database on more than 1,400 pharmaceutical substances registered in the Russian Federation; knowledge base on the drug targets, the impact of which used/discovered for the treatment of cancer, diabetes, tuberculosis, etc. Implemented hypertext links provide associations between over 1200 pharmacological targets, the impact of which is predicted by PASS Online program, with UniProt, KEGG and PDB databases. We also developed SAR Creator software, which allows creating online training sets to develop the (Q)SAR models. We have developed web services for predicting interactions with ~ 80% of the molecular targets that are being studied in the target pharmacotherapeutic area.

УДК 575.112:004

ANDSYSTEM: СИСТЕМА ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ТЕКСТОВ В ОБЛАСТИ БИОЛОГИИ.

Иванисенко В.А., Сайк О. В., Тийс Е.С., Иванисенко Т.В., Деменков П. С.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), ООО "ПБ-СОФТ", Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10
e-mail: salix@bionet.nsc.ru

В настоящее время одним из ключевых подходов к изучению молекулярных механизмов функционирования сложных биологических процессов является компьютерная реконструкция и анализ молекулярно-генетических сетей. Нами была разработана система ANDSystem, основанная на методах автоматического извлечения знаний из текстов научных публикаций и фактографических баз данных (text-mining), которая позволяет проводить реконструкцию и анализ молекулярно-генетических сетей.

Ключевые слова: автоматический анализ текстов; text-mining; ANDSystem; ANDVisio; ANDCell; генные сети, биологические пути.

В настоящее время накоплено огромное количество публикаций в области биологии и биомедицины. Так, например, в базе данных PubMed собрано более 25 миллионов рефератов научных статей по биомедицинской тематике и это число постоянно растет. Для того, чтобы решить проблему эффективного извлечения знаний о молекулярно-генетических объектах из таких больших объемов текстовых данных, были разработаны различные подходы, основанные на простых методах оценки со-встречаемости биологических терминов в предложениях, так и на более сложных, включающих семантико-лингвистический анализ и машинное обучение. Ранее нами была разработана система ANDSystem, которая включает набор инструментов, позволяющих проводить автоматическое извлечение знаний из текстов PubMed и фактографических баз данных (Ivanisenko et al, 2015). Разработанные на настоящий момент системы для автоматического анализа текстов не могут обеспечить 100% полноту извлечения знаний из текстов научных публикаций. В то же время использование нескольких систем для автоматического извлечения знаний из текстов может снизить уровень потерь информации. Другой серьезной проблемой существующих систем является сильно упрощенное описание взаимодействий между различными биологическими объектами. В большинстве существующих систем число различных типов взаимодействий ограничено двумя-тремя, включая со-встречаемость названий объектов в текстах и белок-белок взаимодействия. С другой стороны, наравне с проблемой неполноты извлечения знаний, при реконструкции большинства молекулярно-генетических сетей автоматическими методами возникает проблема «информационного взрыва». Известно, что при реконструкции генной сети методом расширения исходного ядра генами, имеющими непосредственные связи с исходными генами, часто наблюдается очень быстрое (за две-три итерации расширений) превращение исходной генной сети в «галактику». В связи с этим, была разработана новая версия системы ANDSystem, обеспечивающая, с одной стороны, более полное извлечение знаний из документов, а с другой стороны, позволяющая проводить автоматический анализ специфичности реконструируемой генной сети к изучаемому фенотипу или биологическому процессу, что позволяет предотвратить неконтролируемый рост генной сети при ее реконструкции.

БИОИНФОРМАТИКА И IT

ANDSystem позволяет извлекать из текстов научных публикаций взаимодействия между такими биологическими объектами, как заболевания, биологические процессы, белки, гены, микроРНК и метаболиты. Система включает инструменты для автоматического извлечения знаний из научных текстов, представленных в PubMed, и фактографических баз данных. В ANDSystem информация о молекулярно-генетических событиях, извлеченных из текстов и баз данных, хранится в специально созданной базе данных ANDCell. Пользовательский интерфейс системы представлен программой ANDVisio, которая по запросам пользователя обеспечивает поиск информации в базе данных ANDCell, графическую визуализацию, редактирование и анализ реконструируемых молекулярно-генетических сетей и их сохранение в различных форматах. Также программа включает набор инструментов для автоматической реконструкции ассоциативных генных сетей с учетом специфичности связи объектов сети к изучаемому фенотипу или биологическому процессу, что позволяет избежать неконтролируемого расширения генной сети. ANDSystem может быть полезна для интерпретации комплексных мультифакторных экспериментальных данных.

Литература:
1. *Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P. S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology // BMC systems biology. 2015, 9(2), 1.*

UDC 575.112:004

ANDSYSTEM: A TOOL FOR AUTOMATED LITERATURE MINING IN THE FIELD OF BIOLOGY

Ivanisenko V.A., Saik O.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
PBSoft LLC, Novosibirsk, Russia
e-mail: salix@bionet.nsc.ru

The ANDSystem tool incorporates utilities for automated extraction of knowledge from Pubmed and external databases.

Key words: text mining, ANDSystem, ANDVisio, ANDCell, gene networks, pathways

The number of publications in the field of biology and biomedicine growth dramatically. To date, over 25 million abstracts relevant to biology and biomedicine are stored in the PubMed database and it keeps increasing. To address the confounding problem of extraction of information on molecular-genetic objects from texts worldwide, approaches based on algorithms, from the simplest, such as search for co-occurrence of the biological object names in texts, to complex integrating linguistic-semantic analysis, and machine learning have been suggested. Earlier, we developed the ANDSystem tool, which incorporates utilities for automated extraction of knowledge from Pubmed and external databases (Ivanisenko et al, 2015). However, currently existing text-mining systems cannot completely extract all the information contained in scientific articles. At the same time, the combined use of different automated text analysis systems can reduce the information loss. Another significant disadvantage of the existing systems is a simplified description of interactions between various biological objects. In most systems, a number of different interactions types limited by 2-3, including the co-occurrence of the names of objects in the publications and protein-protein interaction. At the same time, along with the problem of lack of information there is another side of the problem arising in the reconstruction of any particular molecular genetic network using automated methods as well: the “information explosion”. It is well known that in the case when the reconstruction process of the network includes the addition of all genes for which there is information that they interact with the started set of genes, very often the “galaxy” can appear on the second or third iteration. Thus, a new version of ANDSystem is developed, providing a more complete extraction of knowledge, on the one hand, and automated check of the specificity of networks features to the studied phenotypic trait or biological process limiting uncontrolled growth of the network during its reconstruction, on the other hand.

ANDSystem provides tools for extraction of relationships between diseases, pathways, proteins, genes, microRNAs and metabolites from scientific texts. The ANDSystem incorporates utilities for automated extraction of knowledge from Pubmed published scientific texts and analysis of factographic databases. ANDCell is a database of ANDSystem containing information on molecular-genetic events retrieved from texts and databases. ANDVisio is a new user’s interface to the ANDSystem, it provides graphic visualization, editing and search features as well as

BIOINFORMATICS AND IT

possibilities to save molecular genetic networks in different formats resulting from user's request. Also, it provides various tools supporting automated reconstruction of associative networks with taking into account the specific relation of objects in the network to the studied phenotypic trait or biological process limiting uncontrolled network expansion. The ANDSystem can assist in the interpretation of complex multifactorial experimental data.

References:
Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P. S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology // BMC systems biology. 2015, 9(2), 1.

УДК 577.1

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОМА ЧЕЛОВЕКА

Пономаренко Е.А., Лисица А.В., Копылов А.Т., Згода В.Г., Арчаков А.И.

Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича, Москва, Россия
119121, г.Москва, ул.Погодинская, д.10, стр.8
e-mail: 2463731@gmail.com

В работе описаны биоинформатические методы, используемые для оценки количества разнообразных видов белков (протеоформ) и определения их содержания в организме человека в норме и при развитии патологических состояний. Именно от решения этих вопросов зависит, смогут ли принести протеомные технологии результаты в области практической медицины.

Ключевые слова: биоинформатика, протеомика, протеом человека, хромосома 18, транскриптомика, масс-спектрометрия.

Протеом – совокупность белков всех органов и тканей. Принимая во внимание существенную сложность протеома и его изменчивость, исследование протеома должно включать два направления: анализ его ширины – оценку количества различных вариантов белков (протеоформ), а также анализ глубины – измерение количества копий каждой протеоформы в конкретном типе биологического материала.

Многообразие протеоформ возникает в основном за счет трех типов молекулярных событий: альтернативного сплайсинга, реализации на уровне протеома одиночных мутаций в геноме и пост-трансляционных модификаций. Для оценки многообразия протеоформ предложено три возможных варианта комбинации указанных выше типов молекулярных событий и расчетные формулы для каждого случая.

При использовании данных из информационных ресурсов, расчетное количество протеоформ в организме человека составляет около 7 млн. В практическом плане более важным является определение ширины протеома конкретного образца ткани. Для расчета количества протеоформ в образцах ткани печени человека и опухолевой клеточной линии HepG2 использовали данные о вариантах альтернативного сплайсинга и мутантных формах, полученные в результате экспериментального исследования транскриптома этих образцов.

Экспериментальное исследование глубины протеома, т.е. анализа количества копий протеоформы в образце, требует знания ее аминокислотной последовательности. Биоинформатический анализ на этапе планирования эксперимента включает оценку потенциального многообразия белков в образце и выявление фрагментов аминокислотных последовательностей (пептидов), специфичных для искомых белков, на поиск которых настраивается прибор – масс-спектрометр.

В рамках выполнения исследования протеома, кодируемого хромосомой 18 человека, было проведено измерение содержания кодируемых на этой хромосоме белков (анализ глубины). Для каждого гена с использованием направленной масс-спектрометрии измеряли содержание только одного, наиболее представленного в образце белка – мастерной формы. Была получена информация о содержании каждого из 275 мастерных белков, кодируемых хромосомой 18, в трех типах биологического материала – плазме крови, клетках ткани печени человека и клеточной линии HepG2.

В практическом плане разработанный алгоритм открывает перспективы для исследования изменения молекулярного протеомного профиля организма в зависимости от внешних факторов с учетом индивидуальных особенностей экспрессии определенных видов белков. После создания пептидного набора, масс-спектрометрическое измерение 300 белков в образце занимает всего несколько часов.

БИОИНФОРМАТИКА И IT

UDC 577.1

PERSPECTIVES ON EXPLORING THE SPACE OF THE HUMAN PROTEOME

Ponomarenko E.A., Lisitsa A.V., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Archakov A.I.

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
119121, Pogodinskaya Street 10, Moscow, Russia
e-mail: 2463731@gmail.com

This work describes bioinformatic approaches used to estimate the number of different types of proteins (proteoforms) and measure their contents in the human body in norm and under various pathological conditions. Whether proteome technologies contribute in the field of practical medicine is dependent on the resolution of these issues.

Key words: bioinformatics, proteomics, human proteome, chromosome 18, transcriptomics, mass-spectrometry.

The proteome is the entire set of proteins in all organs and tissues. Taking into account the variability and its substantial complexity, the proteome study should include two directions: the analysis of the proteome width i.e. the estimation of the number of different variants of proteins (proteoforms), as well as the analysis of its depth – the measurement of the amount of copies of each proteoform in a certain type of biological material.

Proteoform diversity occurs mainly due to three types of molecular events: alternative splicing, single mutations in the genome appearing at the proteome level and post-translational modifications. To evaluate the diversity of proteoforms we proposed three possible combinations of the above types of molecular events and the calculation formulas for each case.

We used data from different information resources and found the number of proteoforms in the human body to be about 7 million. In practical terms, it is more important to estimate the proteome width of a specific tissue sample. To calculate the number of proteoforms in liver tissue and HepG2 cell line samples, we used the data on variants of alternative splicing and the mutations obtained from an experimental study of the transcriptome of these samples.

The experimental study of the proteome depth, i.e. the number of copies of a proteoform in the sample requires the information on the amino acid sequence of each proteoform. At the experiment planning stage, bioinformatic analysis involves the evaluation of the potential diversity of proteins in the sample and detection of the fragments of amino acid sequences (peptides) that are specific for the desired proteins.

In the framework of the study of the proteome encoded by Chromosome 18, we estimated the quantity of the proteins encoded on this chromosome (proteome depth). For each gene, using targeted mass spectrometry method, we measured the content of only one, the most represented protein in the sample – master form. Thus, we obtained the information about the content of each of the 275 master proteins encoded by Chromosome 18 in three types of biological material – blood plasma, human liver tissue cells, and HepG2 cell line.

In practical terms, the developed algorithm offers the prospects for the study of different changes in the molecular proteomic profile of a human body depending on external factors and taking into account individual peculiarities of the expression of certain types of proteins. Following the creation of a set of peptides, mass spectrometric measurement of 300 proteins in a sample takes only a few hours.

.....

РАЗЛИЧНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ БИОФИНОРМАТИКИ ДЛЯ РЕШЕНИЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ЗАДАЧ. ОТ СОЗДАНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СЕТЕЙ ДО РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВ IN SILICO И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Худошин А.Г., Юрьев А.

Elsevier B.V., Amsterdam, Netherlands
115035, Москва, ул. Садовническая д. 82, стр. 2, подъезд 6, офис 2044
e-mail: a.khudoshin@elsevier.com

В докладе представлены примеры использования методов биоинформатики для решения биомедицинских задач в том числе: задач, связанных с построением и исследованием метаболических путей, поиском

BIOINFORMATICS AND IT

новых мишеней для лекарств, поиском и предсказанием специфических бомаркеров, объяснением механизмов и предсказанием токсичности препаратов и побочных эффектов препаратов.

Ключевые слова: биоинформатика, рак груди, персонализированная медицина, биомаркеры, матеболические пути, врожденный гиперинсулинизм, перепрофилирование препаратов, шизофрения

В докладе представлены примеры использования методов биоинформатики для решения биомедицинских задач в том числе: задач, связанных с исследованием метаболических путей, поиском новых мишеней для лекарств, поиском и предсказанием специфических бомаркеров, объяснением механизмов и предсказанием токсичности препаратов и побочных эффектов препаратов. На основе примеров использования платформы Pathway Studio Mammalian[1] показаны преимущества применения методов биоинформатики с точки зрения экономии ресурсов. Описанные примеры включают, но не ограничены следующими: оценка эффективности биомаркеров рака груди, поиск новых назначений для препарата адалимумаб, поиск препаратов против редкого заболевания врожденного гиперинсулинизма, индивидуальный / персонализированный поиск препаратов против рака [2].

Также в докладе представлены примеры использования подхода на основе управления данными по взаимосвязи структуры и активности молекул к решению задач разработки фармпрепаратов. Использование базы данных Reaxys Medicinal Chemistry позволяет быстро решить такие задачи, поиск структур взаимодействующих с определенной мишенью, поиск информации по метаболизму определенного фенотипа, поиск профиля активности и перепрофилирования препаратов будет показано на примере препаратов от шизофрении.

Литература:
1. *Страница продукта Pathway Studio / Официальный вебсайт российского офиса компании Elsevier.[Москва.], 20052007. http://www.elsevierscience.ru/products/pathway-studio/ (дата обращения:19.12.2016).*
2. *Castillos L., Yuryev A. Developing Pathway Collection for Personalized Anti-cancer Therapy // Int J Cancer Clin Res 2016, Vol.3, # 2*

.....

VARIOUS ASPECTS OF BIOINFORMATICS APPLICATION FOR BIOMEDICAL PROBLEMS. FROM THE CREATION OF METABOLIC PATHWAYS TO DEVELOP DRUGS IN SILICO AND PERSONALIZED MEDICINE

Khudoshin A., Yuryev A.

Elsevier B.V., Amsterdam, Netherlands
115035, Moscow, SAdovnicheskaya str, 82 b2, office 2044
e-mail: a.khudoshin@elsevier.com

Examples of application of bioinformatics approach to solve biomedical problems presented. Examples include construction and investigation of metabolic pathways, search for targets for new drugs, search for and prediction of specific biomarkers, explaining the mechanisms and prediction of toxicity of drugs and side effects of drugs.

Key words: bioinformatics, breast cancer, personalised medicine, biomarkers, metabolic pathway, Congenital hyperinsulinsm, drugs reperpusing, schizophrenia

Examples of application of bioinformatics approach to solve biomedical problems presented. Advantages of bioinformatics approach from the view point of resource economy is shown based on application of platform Pathway Studio Mammalian[1]. Detailed examples include but not limited with investigation of metabolic pathways of cancer, search for targets for new drugs for endothelial cancer, assessment of clinical biomarker specificity for multiple sclerosis and of efficacy biomarker for breast cancer, prediction of biomarkers for drug-induced cholestasis, explaining the mechanisms and prediction of toxicity of drugs and side effects of drugs, search of drugs for personalized anti-cancer therapy based on developd pathway collection [2].

Knowledge driven approach in medicinal chemistry application for drugs R&D also presented. Relationship data of chemical structure with biologic activity from Reaxys Medicinal Chemistry let one to solve problems such as search of structures interact with a specific target, finding information on the metabolism of a particular chemical phenotype. Determination of typical biologic activity profile of drugs against schizophrenia and drug repurposing using the profile will be used as an example.

БИОИНФОРМАТИКА И IT

Reference:
1. *Pathway Studio product page / Elsevier.B.V. Official web-site [Amsterdam.]. https://www.elsevier.com/solutions/pathway-studio-biological-research (request date:12.01.2017).*
2. *Castillos L., Yuryev A. Developing Pathway Collection for Personalized Anti-cancer Therapy // Int J Cancer Clin Res 2016, Vol.3, # 2*

УДК 57.087.1

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСА ПРОГРАММ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ И ИХ УЧАСТКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Кечин А.А., Боярских У.А., Филипенко М.Л.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 8
e-mail: a.a.kechin@gmail.com

Разработан комплекс программ для подготовки и анализа таргетного секвенирования экзонов генов и их участков, ассоциированных с заболеваниями. Комплекс имеет следующий функционал: автоматическое конструирование праймеров, вырезание последовательностей праймеров из полученных при секвенировании прочтений, анализ прочтений и выявление вариаций.

Ключевые слова: конструирование и дизайн праймеров, NGS, таргетное секвенирование, анализ данных.

Массовое параллельное секвенирование (MPS) или секвенирование следующего поколения (NGS) – один из наиболее популярных на сегодняшний день методов генетического исследования различных организмов. Он позволяет в короткие сроки и достаточно точно прочитывать протяженные участки молекул ДНК, начиная от генов, кодирующих короткие микроРНК и заканчивая целыми геномами. И одним из наиболее простых ее применений в медицине является поиск мутаций в генах, нарушение которых приводит к развитию социально значимых заболеваний, включая рак молочной железы и яичников, первичные иммунодефициты и другие.

Нами был разработан комплекс программ, позволяющий провести исследование первичной структуры выбранных генов от конструирования праймеров до выявления патогенных мутаций, приводящих к развитию заболевания. Комплекс состоит из следующих программ. (1) Программа по конструированию, или дизайну, праймеров, которая позволяет, по наименованиям генов и участков, предназначенных для анализа, генерировать последовательности праймеров с наилучшими параметрами для проведения мультиплексной амплификации. По умолчанию программой выбираются все кодирующие области генов, а также сайты сплайсинга, однако пользователь может задавать специфические районы генов (2) Программа по вырезанию последовательностей праймеров из получаемых в результате секвенирования прочтений. Разработанная нами программа cutPrimers была сравнена с подобными программами и показала более высокую точность идентификации праймеров (до 1,4 раза увеличение выхода правильно обрезанных прочтений) и большую скорость обработки (более, чем в 2 раза). (3) Программа по анализу прочтений и выявлению вариаций. Программа включает в себя отобранные свободно доступные программы, объединенные в единый протокол с помощью Python-скриптов. В результате работы программы пользователь получает несколько списков вариаций, включая отфильтрованные по выбранным параметрам (минимальный процент прочтений с альтернативным аллелем, минимальное качество вариации - параметр QUAL) и патогенные мутации.

Комплекс программ был проверен и доработан на массиве данных, полученных при секвенировании генов *BRCA1* и *BRCA2* у пациенток больных раком молочной железы и яичников. Нами была показана высокая эффективность (100% чувствительность и специфичность выявления патогенных мутаций), скорость (около 2 часов занимает анализ данных 48 пациентов, 15 млн. прочтений) и удобство использования разработанного комплекса.

BIOINFORMATICS AND IT

UDC 57.087.1

DEVELOPMENT OF THE PROGRAM COMPLEX FOR INVESTIGRATION OF CODING SEQUENCES OF GENES AND THEIR PARTS ASSOCIATED WITH DISEASES

Kechin A.A., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS), Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Lavrentiev av., 8
e-mail: a.a.kechin@gmail.com

We have developed program complex for preparation and analysis of targeted sequencing gene exons and their parts, associated with diseases. The complex has the following features: automatic primer design, trimming primers sequences from reads, processing reads and variant calling.

Key words: primer design, NGS, targeted sequencing, data analysis.

Today massive parallele sequencing (MPS), or next-generation sequencing (NGS), is the most popular method of genetic investigation of different organisms. It allows to quickly and accurately read stretches of DNA molecules from genes encoding short miRNAs to entire genomes. One of the simplest of its applications in medicine is to search for mutations in the genes, the violation of which leads to the development of socially significant diseases, including breast cancer and ovarian cancer, primary immunodeficiency and other.

We have developed a set of programs that allows to study of the primary structure of selected genes by designing primers to detect pathogenic mutations leading to disease development. The complex consists of the following programs. (1) Program of primer design, which allows for the names of genes and sites intended for the analysis, to generate a sequence of primers with the best settings for the multiplex amplification. By default, the program selects the entire coding region of genes and splice sites, but one can set specific gene regions. (2) Program for a cutting of sequences of primers of the resulting sequencing reads. We have developed a program cutPrimers that was compared with similar programs and showed greater accuracy of identification primers (up to 1.4-fold increase in the yield properly trimmed reads) and greater processing speed (more than 2-fold). (3) Program for the analysis of reads and identification of variations. The program includes selected freely available programs, combined into a single workflow using Python-scripts. As a result of the program the user gets several lists of variations, including filtered by selected parameters (minimum percentage readings with the alternative allele, minimum quality variations - QUAL parameter) and pathogenic mutations.

Software package has been tested and refined on the data set obtained by sequencing the BRCA1 and BRCA2 genes in patients with breast and ovarian cancer. We have shown the high efficiency (100% sensitivity and specificity for detection of pathogenic mutations), speed (takes about 2 hours of data analysis of 48 patients, 15 million reads) and usability of the developed complex.

.....

УДК 51-76

ГЛУБИННОЕ ОБУЧЕНИЕ В ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН

Корвиго И., Афанасьев А., Скоблов М.

Лаборатория функционального анализа генома, Московский физико-технический институт, Москва, Россия.
117303, Москва, ул. Керченская, д. 1А, корп. 1
e-mail: ilia.korvigo@gmail.com

Анализ применения нейронных сетей и машинного обучения для решения задач в области биологии и медицины. Использование нейронных сетей для сбора биомедицинских данных и приоритизации аминокислотных замен по патогенности в медико-генетических исследованиях.

Ключевые слова: глубинное обучение, машинное обучение, искусственная нейронная сеть, экзом, на-

БИОИНФОРМАТИКА И IT

следственные заболевания, медицинская генетика.

Невероятный прогресс в области доступных специализированных многопоточных ускорителей привел к резкому скачку в развитии моделей глубинного обучения. За прошедшее десятилетие многие архитектуры, существовавшие прежде лишь на страницах публикаций в области машинного обучения, стали воплощаться на практике, показывая при этом невиданную прежде производительность в решении целого спектра задач от распознавания изображений до формализации текстовой информации, превосходя иногда даже своих человеческих создателей. Всеобщая увлеченность новыми архитектурами нейронных сетей, конечно, не могла обойти стороной вычислительную биологию, в которой эти модели теперь применяются для решения традиционно сложных задач. В докладе будут рассмотрены наиболее популярные современные архитектуры глубоких нейронных сетей и применение машинного обучения (в том числе «старых» нейронных сетей) в разных областях биологии. На примере уже опубликованных работ и собственного опыта будет продемонстрировано, каким образом и насколько успешно эти модели применяются в мире современной биологии, в таких областях как предсказание патогенности мутаций (Ionita-Laza и др., 2016), анализ гистологических препаратов (Litjens и др., 2016), моделирование взаимодействия белков с малыми молекулами (Wallach, Dzamba, Heifets, 2015), предсказание вторичных структур биополимеров (Li, Yu, 2016) и пр. Будет проведён сравнительный анализ того насколько они эффективно работают и какие у них есть возможности.

Также будут представлены результаты собственной работы по предсказанию патогенности единичных несинонимичных замен (nsSNV) в человеческом экзоме, основанной на комбинации нескольких моделей глубинного обучения. Для этого были использованы оригинальные методы для оптимизации параметров архитектуры сетей и массово-параллельная тренировка альтернативных сетей с использованием генетического алгоритма. Получившийся классификатор обладает непревзойденной производительностью по результатам многих тестов и сравнений с наиболее популярными существующими моделями, достигая средней точности свыше 90%. Кроме того, будут продемонстрированы результаты работы по анализу аномалий в пространственной структуре белков при помощи сверточных нейронных сетей, а также используемые методы сбора и фильтрации информации, также основанные на нейронных сетях.

Литература:
1. *Ionita-Laza I. и др. A spectral approach integrating functional genomic annotations for coding and noncoding variants // Nat. Genet. 2016. № November 2015.*
2. *Li Z., Yu Y. Protein Secondary Structure Prediction Using Cascaded Convolutional and Recurrent Neural Networks // 2016.*
3. *Litjens G. и др. Deep learning as a tool for increased accuracy and efficiency of histopathological diagnosis. // Sci. Rep. 2016. Т. 6. № April. С. 26286.*
4. *Wallach I., Dzamba M., Heifets A. AtomNet: A Deep Convolutional Neural Network for Bioactivity Prediction in Structure-based Drug Discovery // arXiv Prepr. arXiv1510.02855. 2015. С. 1–11.*

УДК 51-76

DEEP LEARNING IN COMPUTATIONAL BIOLOGY AND THE IDENTIFICATION OF DELETORIOUS AMINO ACID SUBSTITUTIONS

I. Korvigo, A. Afanasiev, M. Skoblov

Laboratory of functional analysis of the genome, Moscow institute of physics and technology, Moscow, Russia.
117303, Moscow, Kerchenskaya st., 1A/1
e-mail: ilia.korvigo@gmail.com

An analysis of application of neural networks and machine learning to problems in the field of biology and medicine. Neural networks for mining and filtering biomedical information and deleteriousness-based prioritization of amino acid substitutions in medical genetics.

Key words: deep learning, machine learning, artificial neural network, exome, genetic disorder, medical genetics.

The dramatic progress in affordable massively-parallel computation accelerators has greatly intensified the development of deep-learning models. Over the past decade many architectures, which had previously existed

BIOINFORMATICS AND IT

only on the pages of machine-learning papers, were implemented and gained unprecedented performance levels in various use-cases, such as image recognition and text-mining, occasionally outperforming humans. Surely, this deep-learning hype could not leave the field of computational biology untouched, spawning applications to traditionally complicated problems. Here we will overview the most popular modern deep-learning designs and provide a background of machine-learning applications (including the "old-fashioned" neural networks) in various field of biology. Using published research and our own experience as a reference, we will demonstrate how and to which success these models are used in modern biology to predict pathogenic mutations (Ionita-Laza et al., 2016), analyze histological samples (Litjens et al., 2016), model protein-ligand interactions (Wallach, Dzamba, Heifets, 2015), predict secondary structures in biopolymers (Li, Yu, 2016), etc. We will provide a comparative analysis of their usefulness and performance.

We will also present the results of our work on prediction of deleterious nonsynonymous single-nucleotide substitutions (nsSNVs) based on a combination of several deep-learning models. To accomplish that we used a novel technique to optimize networks' hyper-parameters and massively-parallel training of alternative networks via a genetic algorithm. The resulting classifier outperforms all popular methods on several benchmarks and gains accuracy exceeding 90%. Along with that we will demonstrate our preliminary results in anomaly detection in protein spatial structures based on convolutional neural networks, as well as the neural network-based methods we use for data-mining and filtering.

References:
1. *Ionita-Laza I. et al. A spectral approach integrating functional genomic annotations for coding and noncoding variants // Nat. Genet. 2016. № November 2015.*
2. *Li Z., Yu Y. Protein Secondary Structure Prediction Using Cascaded Convolutional and Recurrent Neural Networks // 2016.*
3. *Litjens G. et al. Deep learning as a tool for increased accuracy and efficiency of histopathological diagnosis. // Sci. Rep. 2016. T. 6. № April. C. 26286.*
4. *Wallach I., Dzamba M., Heifets A. AtomNet: A Deep Convolutional Neural Network for Bioactivity Prediction in Structure-based Drug Discovery // arXiv Prepr. arXiv1510.02855. 2015. C. 1–11.*

УДК 544.02

БОЛЬШИЕ ДАННЫЕ В ХИМИИ

Тетко И.В.

Центр Гельмгольца в Мюнхене, Институт структурной биологии, Ингольштэдтер Ландштрассе 1, D-85764 Нойхерберг, Германия
e-mail: itetko@vcclab.org

Анализируются «большие данные» и их влияние на прогресс в химии

Ключевые слова: «большие данные», многозадачное и глубокое обучение, виртуальное химическое пространство, область применения моделей, защищенные криптологические методы расчёта, хемоинформатика.

Термин «большие данные» широко используется в различных областях науки, включая биоинформатику, но является относительно новым для химии. Интерес к этой области исследований усиливается за счет роста крупных публичных и коммерческих баз данных, таких как CheMBL, PubChem, Reaxys, и т.д., а также из-за увеличения количества данных, собранных в частных компаниях. Большие данные представляют потенциал для новых разработок и инноваций в химии. Хотя даже наибольшие данные в химии на порядки меньше чем, например, базы в геномике, они гораздо больше чем те, которые используются в традиционных химических проектах. Следовательно, их анализ и интерпретация требуют применения новых методов, а также соответствующего обучения сотрудников. Проблемы с анализом больших данных в химии появляются в основном из-за их сложности и неоднородности, а не из-за объема самих данных, как, например, в других областях науки. Современные методы машинного обучения, такие как многозадачное и глубокое обучение, могут успешно использоваться для анализа таких данных. Новые защищенные криптологические методы расчёта могут использоваться для одновременного анализа данных и построения совместных моделей на основе данных имеющихся в нескольких фармацевтических кампаниях. Такие методы гарантируют конфиденциальность данных каждого из партнеров на всех этапах расчетов.

БИОИНФОРМАТИКА И IT

Проблемы применения расчетных моделей для анализа больших виртуальных химических пространств будут обсуждены в контексте точности прогноза моделей и их области применения. В конце доклада будет сделан обзор одной из последних инициатив Европейского Союза в области исследований больших данных в рамках проекта «Большие Данные в Химии».

Данная работа получила финансирование от научно-исследовательской и инновационной программы Европейского Союза Горизонт 2020 согласно гранту Марии Склодовской-Кюри № 676434, «Большие Данные в Химии» («BIGCHEM», http://bigchem.eu). Доклад отражает только мнение автора и ни Европейская комиссия, ни Исполнительное исследовательское агентство (REA) не несут никакой ответственности за любое использование материалов этого доклада и содержащейся в нем информации.

Литература:

1. *Tetko, I. V., Engkvist, O., Koch, U., Reymond, J. L., Chen, H. BIGCHEM: Challenges and Opportunities for Big Data Analysis in Chemistry//Mol. Inform. 2016. Vol. 35. № 11-12. P. 615-621.*
2. *Tetko, I. V., Engkvist, O., Chen, H. Does 'Big Data' exist in medicinal chemistry, and if so, how can it be harnessed?// Future Med. Chem. 2016. Vol. 8. № 15. P. 1801-1806.*

УДК 544.02

BIG DATA IN CHEMISTRY

Tetko I.V.

Helmholtz Zentrum München, Institute of Structural Biology, Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg, Germany
e-mail: itetko@vcclab.org

«Big data» and their influence on chemistry filed are analyzed

Key words: «big data», multitask and deep learning, virtual chemical space, applicability domain, multiparty secure computation, chemoinformatics

The concept of 'Big Data' is already used extensively in several fields of science, but it is relatively new to chemistry. The interest in this field is rising due to the growth of large public repositories and commercial databases, such as CheMBL, PubChem, Reaxys, etc. as well as the increasing amounts of data collected in private companies, which hold the potential to be exploited for new development and innovation. While these databases are orders of magnitude smaller than those of e.g. genomics, they are much larger than those used in traditional chemical projects, and hence their analysis and interpretation require the use of new methods, as well as the proper education of personnel as to their usage. The challenges with Big Data analysis in chemistry appear mainly due to complexity and heterogeneity, rather than to volume, as is the case elsewhere. New methods, such as multitask learning and deep learning networks, could be successfully used to explore such data, while the use of secure computation approaches could combine private data in different companies and can further leverage the impact of Big Data while enabling intercompanies collaborations. The challenges with the application of developed models for the analysis of large virtual chemical spaces, such as produced using de novo design or enumerated chemical spaces containing petabytes of even exabytes of structures, will be discussed. The report will be finished with an overview of EU "Big Data in Chemistry" project.

The project leading to this report has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 676434, "Big Data in Chemistry" ("BIGCHEM", http://bigchem.eu). The article reflects only the author's view and neither the European Commission nor the Research Executive Agency (REA) are responsible for any use that may be made of the information it contains.

References:

1. *Tetko, I. V., Engkvist, O., Koch, U., Reymond, J. L., Chen, H. BIGCHEM: Challenges and Opportunities for Big Data Analysis in Chemistry//Mol. Inform. 2016. Vol. 35. № 11-12. P. 615-621.*
2. *Tetko, I. V., Engkvist, O., Chen, H. Does 'Big Data' exist in medicinal chemistry, and if so, how can it be harnessed?// Future Med. Chem. 2016. Vol. 8. № 15. P. 1801-1806.*

BIOINFORMATICS AND IT

УДК 577.21

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ miRNA С mRNA ГЕНА *E2F3*

Айсина Д.Е., Атамбаева Ш.А., Иващенко А.Т.

Казахский национальный университет имени аль_Фараби, Алматы, Казахстан
050038, Алматы, пр.аль-Фараби, 71,
e-mail: a.iavashchenko@gmail.com

Установлены характеристики множественных сайтов связывания miR-1-2121-3p, miR-19-21199-3p, miR-2-3313-3p, miR-1-155-3p, miR-2-4453-3p, miR-3-8100-5p и miR-20-43381-5p в белок-кодирующей области mRNA гена *E2F3*.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, ген E2F3, рак молочной железы, диагностика.

Изменение синтеза miRNA является одной из основных причин развития злокачественных заболеваний, включая рак молочной железы. miRNA могут быть как онкогенами, так и супрессорами опухолей. Нами изучены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA гена транскрипционного фактора *E2F3*, участвующего в развитии рака молочной железы и других онкозаболеваний. Программа MirTarget [1] определяет следующие характеристики связывания miRNA: начало сайта связывания miRNA с mRNA; локализация сайтов связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA; свободная энергия гибридизации ΔG (кДж/моль); отношение ΔG/ΔGm (%) определяли для каждого участка (ΔGm равна свободной энергии связывания miRNA с комплементарной нуклеотидной последовательностью); схемы взаимодействия нуклеотидов между miRNA и mRNA. Из 3701miRNA [2] нами выявлены miRNA, которые имеют от одного до нескольких сайтов связывания в mRNA гена *E2F3* (таблица). Эти miRNA могут связываться в двух участках белок-кодирующей области mRNA. Первый участок CDS с 389 н., содержащий множественные сайты связывания miRNA с интервалом в три нуклеотида, кодирует олигопептид AAVVAAAAAAS, а второй участок CDS с 458 н. кодирует олигопептид AAAAAAAAA. Из восьми паралогичных генов *E2F1 - E2F8,* mRNA *E2F3* имеет большее число сайтов связывания miRNA. Выявленные множественные сайты связывания miRNA не являются случайными. Это подтверждается наличием двух участков CDS в mRNA ортологичных генов *Gorilla gorilla, Chlorocebuss abaeus, Macaca mulatta, Bos taurus* и других животных.

Таблица *- Характеристики связывания miRNA с mRNA гена транскрипционного фактора E2F3.*

miRNA	Начало сайтов, н.	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Длина, н.
miR-1-155-3p (4)	458 – 470	-125 –-132	91 – 95	25
mir-1-2121-3p (8)	449 – 462	-134 – -140	85 – 89	25
miR-19-21199-3p (8)	452 – 464	-134 – -144	85 – 92	25
miR-2-3313-3p (8)	389 – 462	-136 – -142	85 – 89	25
miR-2-4453-3p (3)	453 – 464	-119 – -121	90 – 92	21
miR-3-8100-5p (3)	391 – 460	-129 – -136	88 – 93	24
miR-20-43381-5p (2)	459 – 468	-119 – -125	90 – 95	21

Примечание: *В скобках указано число сайтов связывания.*

mir-1-2121-3p, miR-19-21199-3p и miR-2-3313-3p имеют по восемь сайтов связывания в mRNA гена *E2F3*, что свидетельствует о сильной зависимости экспрессии гена *E2F3* от каждой из выявленных miRNA. Эти miRNA имеют высоко гомологичные нуклеотидные последовательности. Менее гомологичные нуклеотидные последовательности miR-1-155-3p, miR-2-4453-3p, miR-3-8100-5p и miR-20-43381-5p имеют меньшее число сайтов связывания в mRNA гена *E2F3*. Величина ΔG варьирует в интервале от -119 kJ/mole до -144 kJ/mole, что говорит о сильном взаимодействии miRNA с mRNA гена *E2F3*. Выявленные miRNA могут в значительной степени угнетать синтез транскрипционного фактора E2F3, участвующего в развитии рака молочной железы. Наноразмерные miRNA циркулируют в крови, поэтому они перспективны для разработки метода ранней неинвазивной диагностики онкологических заболеваний.

БИОИНФОРМАТИКА И IT

Литература:
1. *IvashchenkoA. et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes// Bioinformation. 2014. Vol. 10. N.7. P.423-427.*
2. *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

miRNA INTERACTION WITH mRNA OF *E2F3* GENE

Aisina D.E., Atambayeva Sh.A., Ivashchenko A.T.

al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
050038, Almaty, al-Farabi avenue, 71,
e-mail: a.iavashchenko@gmail.com

Characteristics of multiple binding sites for miR-1-2121-3p, miR-19-21199-3p, miR-2-3313-3p, miR-1-155-3p, miR-2-4453-3p, miR-3-8100-5p and miR-20-43381-5p in the protein-coding region of the mRNA E2F3 gene have been established.

Key words: miRNA, mRNA, E2F3 gene, breast cancer, diagnostics.

Early diagnosis of breast cancer improves the efficiency of treatment. With nanosized miRNA, which can circulate in the blood, it is possible to reliably control the development of malignant tumors. Changing of miRNA synthesis is one of the main causes of many pathologies, including breast cancer. miRNA can be both as oncogenes and as tumor suppressors also. In the work have been studied the characteristics of the interaction of miRNA with mRNA of gene of the transcription factor *E2F3*, that participating in the development of breast cancer and other oncologic diseases. The MirTarget program [1] defines the following features of binding: the start of the initiation of miRNA binding to mRNAs; the localization of miRNA binding sites in the 5'UTRs, CDSs and 3'UTRs of the mRNAs; the free energy of hybridization ΔG (kJ/mole); the ratio ΔG/ΔGm (%) was determined for each site (ΔGm equals the free energy of miRNA binding with its perfect complementary nucleotide sequence); the schemes of nucleotide interactions between the miRNAs and the mRNAs. From the 3701 miRNA [2] we identified miRNA which have from one to several binding sites on mRNA of *E2F3* gene (table). These miRNA can be bound in two sites of protein coding region of mRNA. The first site of CDS with 389 nt, that containing multiple miRNA binding sites at intervals of three nucleotides, encodes the oligopeptide AAVVAAAAAAS, and a second site of CDS with 458 nt encodes the oligopeptide AAAAAAAAA. Among the eight paralogous human genes *E2F1- E2F8,* mRNA of *E2F3* have binding sites with miRNA. Identified multiple binding sites of different miRNA are not random.

Table Characteristics of binding miRNA with mRNA of the transcription factor *E2F3* gene

miRNA	Start of sites, nt	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt
miR-1-155-3p (4)	458 – 470	-125 to -132	91 – 95	25
miR-1-2121-3p (8)	449 – 462	-134 to -140	85 – 89	25
miR-19-21199-3p (8)	452 – 464	-134 to -144	85 – 92	25
miR-2-3313-3p (8)	389 – 462	-136 to -142	85 – 89	25
miR-2-4453-3p (3)	453 – 464	-119 to -121	90 – 92	21
miR-3-8100-5p (3)	391 – 460	-129 to -136	88 – 93	24
miR-20-43381-5p (2)	459 – 468	-119 to -125	90 – 95	21

Note: *In parentheses is the number of binding sites.*

This is confirmed by the presence of two sites of CDS in mRNA of orthologous genes *Gorilla gorilla, Chlorocebuss abaeus, Macaca mulatta, Bos taurus* and other animals. Mir-1-2121-3p, miR-19-21199-3p and miR-2-3313-3p have

BIOINFORMATICS AND IT

eight binding sites on the mRNA of *E2F3* gene that shows a strong dependence of the expression of *E2F3* gene from each of the identified miRNA. These miRNA have highly homologous nucleotide sequences. Less homologous nucleotide sequences miR-1-155-3p, miR-2-4453-3p, miR-3-8100-5p and miR-20-43381-5p have smaller number of binding sites on the mRNA of *E2F3* gene. The value of ΔG varies in the range of -119 to -144 kJ/mole indicating a strong interaction between the miRNA with mRNA of *E2F3* gene. Identified miRNA can significantly inhibit the synthesis of the transcription factor E2F3, involved in oncogenesis. These miRNA are promising for developing a method of non-invasive early diagnosis of breast cancer.

References:
1. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes// Bioinformation. 2014. Vol. 10. N.7. P.423-427.*
2. *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.*

УДК 577.322

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ Aβ ПЕПТИДОМ

Галзитская О. В., Селиванова О. М., Сурин А. К., Марченков В. В., Джус У. Ф., Григорашвили Е. И., Суворина М. Ю., Глякина А. В., Довидченко Н. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук, 142290, Пущино, Московская обл., ул. Институтская д. 4
e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

Изучение амилоидных структур и процесса их формирования были проведены для синтетических и рекомбинантных препаратов Aβ40 и Aβ42. Показано, что кольцеобразный олигомер является основным строительным блоком для формирования зрелых фибрилл. Именно такие кольцевые олигомеры и зрелые фибриллы, состоящие из кольцевых олигомеров наблюдаются с помощью метода электронной микроскопии. Следует отметить, что механизм формирования фибрилл именно из кольцевых олигомеров описан нами впервые. При этом наши расчетные и экспериментальные данные вполне согласуются друг с другом.

Ключевые слова: амилоидогенные участки, амилоиды; олигомеры, ядро протофибриллы, линейная и экспоненциальная кинетики;

Как показали недавние исследования – амилоидообразование в некоторых случаях является патологическим процессом (образование бляшек в мозгу при болезни Альцгеймера), в то время как в других случаях может являться адаптационной особенностью организма. По упрощенной схеме процесс формирования фибрилл проходит в три основные стадии: измененное состояние мономера, формирование олигомерной структуры и образование зрелых фибрилл. Самый загадочный момент в этой схеме – процесс перехода олигомера в зрелую фибриллу. Вопрос о размере зародыша фибрилл остается открытым. Изучение амилоидных структур и процесса их формирования были проведены для синтетических и рекомбинантных препаратов Aβ40 и Aβ42. После того, как экспериментальные данные были проанализированы, то выяснилось, что процесс амилоидообразования как для Aβ40, так и для Aβ42 пептидов проходит по сценарию ветвления с образованием ядер вторичной нуклеации. Стоит отметить, что размеры ядер (как первичной, так и вторичной нуклеации) для агрегатов Aβ42 пептида оказались больше, чем для агрегатов Aβ40 пептида. Так, ядро фибриллы Aβ42 равно 3 мономерам, а ядро вторичной нуклеации 2, в то время как для фибрилл Aβ40 размеры ядер равны 2 и 1 мономерам. Одним из аспектов изучения амилоидогенеза является определение участков белковой цепи, формирующих остов амилоидной фибриллы. Нами были теоретически предсказаны амилоидогенные участки пептида Aβ40, способные формировать амилоидную структуру – это участки 16–21 и 32–36 а.о. При помощи метода тандемной масс-спектрометрии эти участки были определены экспериментально. Показано, что участки пептида Aβ40 с 16 по 22 и с 28 по 40-й а.о. устойчивы к воздействию протеаз, т.е. есть входят в остов амилоидной фибриллы. Полученные нами результаты хорошо коррелируют с результатами теоретического предсказания. Детали механизма формирования фибрилл оказались довольно необычными в выбранных нами экспериментальных условиях. Оказалось, что мономером фибриллы служит не одиночный пептид, а олигомер, состоящий из нескольких пептидов, уложенных в виде кольца (3-6 молекул). Такой первичный олигомер является основой для

БИОИНФОРМАТИКА И IT

образования более крупного кольцеобразного олигомера/протофибриллы. В свою очередь кольцеобразный олигомер или протофибрилла, состоящая из нескольких первичных олигомеров, является основным строительным блоком для формирования зрелых фибрилл. Именно такие кольцевые олигомеры и зрелые фибриллы, состоящие из кольцевых олигомеров, наблюдаются с помощью метода электронной микроскопии. Если на начальных временах формирования фибрилл можно наблюдать кольцевые олигомеры, то при удлинении времени инкубации препарата Aβ пептида наблюдаются только зрелые фибриллы. Следует отметить, что механизм формирования фибрилл именно из кольцевых олигомеров описан нами впервые. При этом наши расчетные и экспериментальные данные вполне согласуются друг с другом.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант №14-14-00536.

UDC 577.322

MOLECULAR MECHANISM OF AMYLOID FORMATION BY Aβ PEPTIDE

Galzitskaya O. V., Selivanova O. M., Surin A. K., Marchenkov V. V., Dzhus U. F., Grigorashvili E. I., Suvorina M. Yu., Glyakina A. V., Dovidchenko N. V.

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 4 Institutskaya str., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia
e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

The study of amyloid structures and the process of their formation were investigated for synthetic and recombinant Aβ40 and Aβ42 peptides. It is shown that the annular oligomer is the basic building block to form mature fibrils. Such annular oligomers and mature fibrils composed of the ring oligomers are observed via electron microscopy method. It should be noted that the mechanism of formation of fibrils namely from the annular oligomers described by us the first time. In addition, our calculations and the experimental data are quite consistent with each other.

Key words: amyloidogenic segments, amyloid; oligomer, nucleus of protofibril, linear and exponential aggregation kinetics.

The recent studies show that the process of amyloid formation in some cases is a pathological process (formation of plaques in the brain in Alzheimer's disease), whereas in other cases it may be adaptive feature of the organism. In the simplified scheme the process of formation of fibrils takes place in three main stages: an altered state of monomer, formation of the oligomer structure, and formation of mature fibrils. Currently the most enigmatic in this scheme is the transition of oligomers to the mature fibril. The question about the size of the nuclei fibrils remains open. The study of amyloid structures and the process of their formation were conducted for synthetic and recombinant Aβ40 and Aβ42 peptides. After the experimental data was analyzed, it was found out that the process of amyloid formation by both Aβ40 and Aβ42 peptides passes by the branching scenario with formation of the nuclei of the secondary nucleation. It should be noted that the size of the nuclei (both the primary and secondary nucleation) for aggregates of Aβ42 peptide were greater than for aggregates of Aβ40 peptide. Thus, the primary nucleus is 3 monomers for Aβ42 fibrils, and 2 monomers for the secondary nucleation, while the dimensions for Aβ40 fibrils are 2 and 1 monomers, correspondingly. One aspect of the study of amyloid formation is to determine the regions of protein chains that are responsible for fibril formation. We have theoretically predicted the amyloidogenic regions of Aβ40 peptide which are capable of amyloid structure formation: from 16 to 21 and from 32 to 36 amino acid residues. Using the method of tandem mass spectrometry, these regions were determined experimentally. It was demonstrated that regions from 16 to 22 and from 28 to 40-th amino acid residues of Aβ40 peptide are resistant to proteases, i.e. they have been included in the core of the amyloid fibril. Our results correlate well with the results of our theoretical predictions. The details of the mechanism of amyloid formation were quite unusual in our chosen experimental conditions. It was found that the building block for amyloid fibril is not a monomer, but this is an oligomer consisting of multiple peptides, arranged in a ring (3-6 molecules). This oligomer is the primary basis for the formation of a larger annular oligomer / protofibrils. In turn, the annular oligomer or protofibril consisting of several primary oligomers is the basic building block to form mature fibrils. Such ring oligomers and mature fibrils, consisting of ring oligomers were observed by the method of electron microscopy. If at the initial time of formation of fibrils one can possible to observe ring oligomers of Aβ peptide, then after increasing of the incubation time one can observe only mature fibrils. It should be noted that the mechanism of amyloid formation from the annular oligomers is described by us the first time. In addition, our calculations and the experimental data are quite consistent with each other.

This study was supported by the Russian Science Foundation (grant number 14-14-00536).

BIOINFORMATICS AND IT

УДК 577.325.2

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ С БЕТА-ЛАКТАМАЗАМИ СЕМЕЙСТВА ТЕМ

Упоров И.В., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Рубцова М.Ю., Егоров А.М.

Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет
e-mail: iuporov@enzyme.chem.msu.ru

Изучена структура комплексов бета-лактамных антибиотиков с бета-лактамазами семейства ТЕМ. Определены аминокислотные остатки белка, связывающие молекулы антибиотиков.

Ключевые слова: Бета-лактамные антибиотики и ингибиторы, бета-лактамазы семейства ТЕМ.

Создание новых антибиотиков является актуальной задачей, решение которой требует понимания механизмов взаимодействия молекул антибиотиков с ферментами, против которых они направлены. Нами проведены исследования взаимодействия бета-лактамных антибиотиков с бета-лактамазами семейства ТЕМ. С использованием метода молекулярной динамики было проведено исследование структуры комплексов связывания четырёх бета-лактамаз (ТЕМ-1,32,37,39) с пятью молекулами, являющимися субстратами (CENTA, цефалотин) и ингибиторами (сульбактам, тазобактам, клавулановая кислота) сериновых бета-лактамаз. Начальное положение субстрата в активном центре фермента задавалось ручным докингом, последующая молекулярная динамика приводила к формированию равновесной структуры комплекса фермент/субстрат. Комплексы оставались стабильными на протяжении всего времени моделирования, были вычислены средние энергии взаимодействия фермент-субстрат на заключительной части траектории и показано, что эти значения статистически достоверно различаются между собой.

Сравнение энергий взаимодействия каждого из ферментов с пятью рассмотренными субстратами позволяет сделать следующее выводы. Чем «тяжелее» субстрат, т.е. чем длиннее его заместители в соответствующих положениях бета-лактамного и пяти/шести членного колец, тем более интенсивно они связываются к каждым из ферментов. Наши данные свидетельствуют о том, что ингибиторы связываются с бета-лактамазами, демонстрирующими ингибитор резистентный фенотип, более интенсивно (с большей афинностью) по сравнению с ТЕМ-1.

Визуальный анализ полученных траекторий позволил определить доминирующую моду связывания и провести детальный анализ взаимодействий субстрата с остатками белка для каждого комплекса. Выявлены взаимодействия, приводящие к более тесному связыванию CENTA с ТЕМ-1 по сравнению со связыванием цефалотина с тем же белком. Это разница в средних энергиях должна приводить существенно меньшей константе Михаэлиса для CENTA, чем для цефалотина, что было экспериментально продемонстрировано в нашей лаборатории.

.....

UDC 577.325.2

STUDIES OF STRUCTURE OF COMPLEXES BETWEEN BETA-LACTAM ANTIBIOTICS AND FAMILY TEM BETA-LACTAMASES

Uporov I.V., Grigorenko V.G.,Andreeva I.P., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M.

Chemistry department of M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie Gory 1/3, GSP-1, Moscow State University, Chemistry Department
e-mail: iuporov@enzyme.chem.msu.ru

Structure of beta-lactam/beta-lactamase (TEM family) complexes have been explored by mean of molecular dynamics simulations. The amino acid residues forming interaction with substrate have been found.

Key words: bata-lactam antibiotics and inhibitord, beta-lactamase of TEM family.

New antibiotics are in desperate need from modern clinics. Inventing of new antibacterial agents requires understanding of interaction between antibiotics molecule and its targets. We have carried out molecular dynamics simulations of interaction between beta-lactam molecules (CENTA, cephalotin, sulbactam, tazobactam and

БИОИНФОРМАТИКА И IT

clavulanic acid) and beta-lactamases of TEM family (TEM-1,32,37,39). For each studied system, substrate initially was positioned in enzyme active site followed by nanoseconds long molecular dynamics simulations. In course of dynamics, substrate and surrounding protein residues adopted an equilibrium conformation which can be considered as dominant binding mode. Studied complexes remained intact in course of trajectory that let us to calculate the mean interaction energy, which statistically differ from each pair of complexes.

Comparison the interaction energies of enzyme with five sulbactam molecules lead us to following observations. The heavy substrates, i.e. with long substitutes in corresponding positions of beta-lactam and/or 5/6-members ring, demonstrated the intense enzyme binding comparing to light substrates. Our results demonstate that beta-lactam inhibitors (sulbactam, tazobactam and clavulanic acid) bind inhibitory resistant beta-lactamases (TEM-32,37,39) with higher affinities comparing to TEM-1 enzyme.

Visual trajectories analysis allowed us to point out the principal protein residues participating in substrates binding and forces which stabilize complexes structure. Analysis of CENTA/TEM-1 complex in comparison with cephalotin/TEM-1 one let us to explain the difference in Michaelis constants of these complexes, observed in vivo in our laboratory.

УДК 575.852

ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ В МИТОХОНДРИЯХ ИНФУЗОРИЙ И ОДНОДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ

Любецкий В.А., Рубанов Л.И., Горбунов К.Ю., Зверков О.А., Селиверстов А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, Россия
127051, Москва, Большой Каретный переулок, д. 19 стр. 1,
e-mail: lyubetsk@iitp.ru

На основе оригинального принципиально нового алгоритма определения высококонсервативных элементов мы исследовали митохондриальные геномы в весьма далёких таксономических группах; в докладе будут представлены, в частности, результаты по инфузориям и однодольным растениям.

Ключевые слова: высококонсервативные элементы; митохондрии; инфузории; однодольные растения.

Традиционно изучение эволюции видов в значительной мере опиралось на сравнительный анализ геномных областей, кодирующих рРНК и белки, не считая ещё более традиционного анализа морфологических признаков. Позже к этому присоединился анализ регуляторных элементов и геномной структуры в целом. Недавно методы филогенетического анализа расширились за счёт определения ультраконсервативных (УКЭ) и высококонсервативных элементов (ВКЭ). Модели ВКЭ встретили значительные алгоритмические трудности, которые вначале привели к биологически мало обоснованным ограничениям в моделях, даже для относительно простой задачи определения УКЭ. В [1] эти ограничения были преодолены за счёт нового быстрого, эффективного и математически обоснованного алгоритма. Сравнение различных методов филогенетического анализа привело нас к неожиданному результату: по крайней мере для некоторых органелл и таксонов, структура ВКЭ, как и структура генома в целом, рассмотренная в [2], уже достаточна для адекватного описания эволюции, хотя эти структуры содержат относительно мало информации о геноме. Мы также использовали ВКЭ для определения промоторов и регуляторных элементов генома, что также важно для описания эволюционных сценариев. В докладе мы сравним модели митохондриальной эволюции, опирающиеся на весьма различные описания генома, друг с другом и с информацией об эволюции соответствующих видов. Полные списки найденных ВКЭ для инфузорий и однодольных растений можно найти на странице http://lab6.iitp.ru/-/hce16.

В качестве примера упомянем предсказанный в ходе поиска ВКЭ промотор у *Phoenix dactylifera*. Он допускает два варианта: CATAAGAtA и gATAAGAaA; строчные буквы указывают на отклонение от экспериментального промотора у гороха CRTAAGAGA. Этот промотор расположен после гена РНК-полимеразы на комплементарной цепи и может регулировать экспрессию этого гена, инициируя транскрипцию в антисмысловом направлении. Возможны два механизма регуляции: прерывание транскрипции из-за столкновений РНК-полимераз до завершения транскрипции гена, кодирующего РНК-полимеразу, или образование дуплекса из двух комплементарных РНК, препятствующих трансляции. Аналогичная картина была описана при моделировании транскрипции в пластидах растений и митохондриях хордовых животных в [3, 4].

Литература:
1. *Rubanov L.I., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Lyubetsky V.A., A method for identification of highly conserved elements and evolutionary analysis of superphylum Alveolata // BMC Bioinformatics. 2016. V. 17. N. 385.*
2. *Lyubetsky V.A., Gershgorin R.A., Seliverstov A.V., Gorbunov K.Yu., Algorithms for reconstruction of chromosomal structures // BMC Bioinformatics. 2016. V. 17, N. 40.*
3. *Lyubetsky V.A., Zverkov O.A., Rubanov L.I., Seliverstov A.V. Modeling RNA polymerase competition: the effect of σ-subunit knockout and heat shock on gene transcription level // Biology Direct. 2011. V. 6, N. 3.*
4. *Lyubetsky V.A., Zverkov O.A., Pirogov S.A., Rubanov L.I., Seliverstov A.V. Modeling RNA polymerase interaction in mitochondria of chordates // Biology Direct. 2012. V. 7, N. 26.*

UDC 575.852

HIGHLY CONSERVED ELEMENTS IN MITOCHONDRIAL GENOMES OF CILIATES AND MONOCOTS

Lyubetsky V.A., Rubanov L.I., Gorbunov K.Yu., Zverkov O.A., Seliverstov A.V.

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

On the basis of a novel algorithm of highly conserved elements detection we explored mitochondrial genomes in quite distant taxonomic groups, two of which, ciliates and monocots, were chosen for the presentation.

Key words: highly conserved elements; mitochondria; ciliates; monocots.

Traditionally, studies of species evolution largely relied on the comparative analysis of genomic regions coding for rRNAs and proteins apart from the analysis of morphological characters. Later, analyses made use of regulatory elements and the structure of the genome as a whole. More recently, phylogenetic analyses are incorporating ultraconserved elements (UCEs) and highly conserved elements (HCEs). Models of HCE initially faced considerable algorithmic challenges, which gave rise to (often unnatural) constraints in these models even for a conceptually simple task such as the identification of UCEs. In [1] these constraints are being addressed with a fast efficient and mathematically verified solution with no constraints on the underlying model. This approach have led us to an unexpected result: at least for some organelles and taxa, the HCE structure (as well as the general genome structure discussed in [2]), despite itself containing relatively little information, still adequately resolves the evolution. We also used the HCEs identification in searching for promoters and regulatory elements that characterize the functional evolution of the genome. In the presentation, we will compare the mitochondrial evolution inferred using substantially different structures mentioned above as well as their genomic structures, with each other and with evolution of the corresponding species. The full lists of the discovered HCEs can be found at http://lab6.iitp.ru/-/hce16.

Let us consider an example of a potential promoter in the mitochondrion of *Phoenix dactylifera*. It allows two variants: CATAAGAtA and gATAAGAaA. Here, lowercase letters indicate deviations from the experimentally shown promoter sequence CRTAAGAGA in *Pisum*. It is located downstream of tRNA polymerase gene on the complementary strand and presumably regulates the gene expression by initiating of transcription in the antisense direction. The regulation may involve two different mechanisms: transcription termination due to RNA polymerases collision before completion of the RNA polymerase gene transcription, or formation of a duplex from two complementary RNA changes, which prevents the translation. The same pattern in plant plastids and chordates mitochondria is described in connection with modeling transcription in [3, 4].

References:
1. *Rubanov L.I., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Lyubetsky V.A., A method for identification of highly conserved elements and evolutionary analysis of superphylum Alveolata // BMC Bioinformatics. 2016. V. 17. N. 385.*
2. *Lyubetsky V.A., Gershgorin R.A., Seliverstov A.V., Gorbunov K.Yu., Algorithms for reconstruction of chromosomal structures // BMC Bioinformatics. 2016. V. 17, N. 40.*
3. *Lyubetsky V.A., Zverkov O.A., Rubanov L.I., Seliverstov A.V. Modeling RNA polymerase competition: the effect of σ-subunit knockout and heat shock on gene transcription level // Biology Direct. 2011. V. 6, N. 3.*
4. *Lyubetsky V.A., Zverkov O.A., Pirogov S.A., Rubanov L.I., Seliverstov A.V. Modeling RNA polymerase interaction in mitochondria of chordates // Biology Direct. 2012. V. 7, N. 26.*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

УДК 575.8

АНАЛИЗ ЭВОЛЮЦИИ ПУТИ БИОСИНТЕЗА АУКСИНА У НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ

Турнаев И.И., Гунбин К.В., Суслов В.В., Акбердин И.Р., Колчанов Н.А., Афонников Д.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 10
e-mail: ada@bionet.nsc.ru

Проведены реконструкция и анализ филогении ферментов, вовлеченных в основного пути биосинтеза ауксина растений. Результаты подтверждают высказанную ранее гипотезу о горизонтальном переносе генов TAA/YUCCA из нерастительных таксонов в таксоны наземных растений. Показано, что молекулярная эволюция ферментов TAA/YUCCA тесно связана с эволюцией развития наземных растений.

Ключевые слова: путь биосинтеза ауксина, ратсения, эволюция, горизонтальный перенос генов, флавин монооксигеназы YUCCA.

В настоящее время признано, что основной путь биосинтеза ауксина в растениях включает синтез триптофана из хоризмата и последующий синтез ауксина из триптофана, включающий две реакции, контролируемых ферментами TAA и YUCCA. Однако, происхождение этого пути в растениях до сих пор неясно.

Проведен всесторонний анализ молекулярной эволюции последовательностей ферментов, участвующих в основном пути биосинтеза ауксина в растениях. Характеристикой первого этапа пути (биосинтеза триптофана) является вертикальная эволюция ферментов, соответствующая принятой в настоящее время картине эволюции растений и небольшое увеличение количества гомологов этих ферментов в геномах высших растений. Наоборот, характеристикой эволюции ферментов TAA/YUCCA является несоответствие их филогении с эволюцией растений; это согласуется с гипотезой о горизонтальном переносе генов TAA/YUCCA из нерастительных таксонов в геномы наземных растений. Анализ филогении ферментов YUCCA показал, что дивергенция двух крупных подсемейств (YUC1-9 и YUC10/11) произошла во время происхождения папоротников и, по-видимому, связана с развитием новых репродуктивных стратегий наземных растений (споры и семена). Еще одной особенностью в эволюции гена YCCA является резкое увеличение числа его ортологов в геномах покрытосеменных, что может объясняться тем, что этот фермент контролирует лимитирующую стадию в биосинтезе ауксина.

.....

UDC 575.8

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE ENZYMES INVOLVED IN THE MAIN AUXIN BIOSYNTHESIS PATHWAY IN PLANTS

Turnaev I.I., Gunbin K.V., Suslov V.V., Akberdin I.R., Kolchanov N.A., Afonnikov D.A.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave. 10
e-mail: ada@bionet.nsc.ru

The phylogeny of the enzymes involved in the main auxin biosynthesis pathway in plants has been comprehensively analyzed. The results support the existing hypothesis on a horizontal transfer of the TAA/YUCCA genes from non-plant to land plants taxa. It was shown that TAA/YUCCA molecular evolution is tightly related to evolution of the plant development.

Key words: auxin biosynthesis pathway, plant, evolution, horizontal gene transfer, YUCCA flavin monooxygenases.

It is currently recognized that the main auxin biosynthesis pathway in plants comprises the tryptophan synthesis from chorismate and subsequent auxin synthesis from tryptophan, which consists of two reactions controlled by the enzymes TAA and YUCCA. Despite recent intensive research, the evolutionary origin of this pathway in plants is still unclear.

BIOINFORMATICS AND IT

The phylogeny of the enzymes involved in the main auxin biosynthesis pathway in plants has been comprehensively analyzed. Characteristic of the first stage in this pathway, tryptophan biosynthesis, are a vertical evolution of its enzymes matching the currently accepted plant evolution pattern and a small increase in the number of homologs in higher plants. On the contrary, characteristic of the enzymes involved in the second stage of this pathway is a misfit of their phylogeny with plant evolution; this complies with the existing hypothesis on a horizontal transfer of the TAA/YUCCA genes from non-plant to land plants taxa. A detailed analysis of the YUCCA phylogeny demonstrated that divergence of its two large subfamilies (YUC1-9 and YUC10/11) occurred at the time of origin of ferns and may have relationship with development of new reproductive strategies of land plants (spores and seeds). Another specific feature in the evolution of YUCCA gene is a drastic increase in the number of its orthologs in the angiosperm genomes.

An unusual pattern of the evolution of YUCCA family as compared with other proteins may be explained by that this family controls the limiting stage in auxin biosynthesis.

УДК 58.009:577.175.1

АУКСИН КООРДИНИРУЕТ СТЕПЕНЬ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ВНУТРИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП

Миронова В. В., Вибе Д. С. Омельянчук Н.А.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Новосибирск, Россия 630090, пр. Академика Лаврентьева 10
e-mail: kviki@bionet.nsc.ru

Выявлены группы генов функционально связанных между собой и примерно в одинаковой степени, изменяющие свою экспрессию в ответ на обработку ауксином. Установлено, что промоторы генов, принадлежащих некоторым из этих функциональных групп, обогащены мотивами.

Ключевые слова: Фитогормоны, первичный ответ, регуляция транскрипции

Полногеномные эксперименты позволяют количественно оценить степень изменения экспрессии, тем не менее, информация о степени изменения экспрессии в ответ на внешние условия используется не в полном объеме. В основном, данные о степени изменения экспрессии генов используются в качестве порогового значения для выявления дифференциально экспрессирующихся генов или для кластеризации генов. В данной работе мы использовали количественные оценки, чтобы показать ассоциацию некоторых биологических процессов с определенной степенью изменения экспрессии генов в ответ на ауксин.

Для этого мы провели RNA-seq эксперимент по обработке корней *Arabidopsis thaliana* ауксином, который в настоящее время является наиболее изученным гормоном растений. Чтобы подтвердить наши результаты мы также использовали данные полногеномных микрочип экспериментов по обработке ауксином (Lewis et al., 2013). Нами был разработан пакет программ для поиска терминов Генной Онтологии (ГО) (Ashburner et al., 2000) значимо обогащенных в группах генов со схожей степенью изменения экспрессии.

В результате, помимо ГО терминов ассоциированных с полным спектром степени изменения экспрессии, мы обнаружили более ста ГО терминов, ассоциированных с определенными интервалами изменения экспрессии. Данный подход позволил более полно описать действие ауксина на молекулярном, клеточном и тканевом уровне, а также выявить функциональные группы генов, регулируемые ауксином с примерно одинаковой степенью изменения экспрессии. Аналогичный подход был применен к данным по распознаванию мотивов в промоторах ауксин-чувствительных генов. Как результат, были выявлены мотивы, обогащенные в группах генов изменяющих свою экспрессию в определенных интервалах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 15-34-20870.

Литература:
1. Ashburner, M. Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Sherlock, G. Gene Ontology: tool for the unification of

БИОИНФОРМАТИКА И IT

biology // Nat. Genet. 2000. № 25. P. 25–29.
2. Lewis, D. R., Olex, A. L., Lundy, S. R., Turkett, W. H., Fetrow, J. S., Muday, G. K. A kinetic analysis of the auxin transcriptome reveals cell wall remodeling proteins that modulate lateral root development in Arabidopsis // Plant Cell. 2013. № 25. P. 3329–46.

UDC 58.009:577.175.1

AUXIN COORDINATES TRANSCRIPTIONAL FOLD CHANGES FOR THE GENES BELONGING TO PARTICULAR FUNCTIONAL GROUPS

Mironova V.V., Wiebe D.S., Omelyanchuk N.A.

Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
Novosibirsk, Russia, 630090, 10 Lavrentyeva avenue
e-mail: kviki@bionet.nsc.ru

The groups of genes functionally related to each other and changing their expression in the similar intervals of fold change in the response to auxin were revealed. It was found that promotors of genes belonging to certain functional groups were enriched with motifs.

Key words: Plant hormone, primary response, transcription regulation.

Whole-genome experiments describe quantitatively the changes in transcript contents; however, the quantitativeness is rather underused. The fold changes in expression levels are usually considered only as the thresholds to select differentially expressed genes or as the measure for gene clustering. Here we made use the quantitative data to show that in response to stimulus, some biological processes may have specific windows of fold changes.

To do so we performed RNA-seq experiment for Arabidopsis thaliana roots treated with auxin, currently the most widely studied plant hormone. To prove our findings we also analyzed data obtained from microarray experiments on auxin treatment (Lewis et al., 2013). The pipeline was developed to search for the Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000) terms significantly enriched for the genes united by similar fold changes in expression levels.

In result of the search, along with GO terms characterizing the whole set of differentially expressed genes, we found more than hundred GO terms specific for genes regulated by auxin within definite fold interval. This approach allowed us to describe auxin action at the molecular, cellular and tissue levels more comprehensively, and to reveal the functional groups where genes were regulated by auxin with the similar fold changes. The same approach applied to motif search in promoters of auxin responsive genes revealed several motifs enriched in genes changing their expression in specific fold intervals.

The work was performed under financial support of the Russian Foundation for Basic Research, project № 15-34-20870.

References:

1. Ashburner, M. Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Sherlock, G. Gene Ontology: tool for the unification of biology // Nat. Genet. 2000. № 25. P. 25–29.
2. Lewis, D. R., Olex, A. L., Lundy, S. R., Turkett, W. H., Fetrow, J. S., Muday, G. K. A kinetic analysis of the auxin transcriptome reveals cell wall remodeling proteins that modulate lateral root development in Arabidopsis // Plant Cell. 2013. № 25. P. 3329–46.

BIOINFORMATICS AND IT

УДК 573.7:57.056

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ХРОМАТИНА В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРВИЧНОГО ОТВЕТА НА ЭТИЛЕН У *ARABIDOPSIS THALIANA* НА ОСНОВАНИИ КОМПЬЮТЕРНОГО АНАЛИЗА ПОЛНОГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

Землянская Е.В., Левицкий В.Г., Ощепков Д.Ю., Миронова В.В.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
630090, Россия, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10
e-mail: ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

На основании анализ сайтов связывания ТФ EIN3, полученных методом ChIP-Seq (пиков) у *A. thaliana* и классифицированных по типу хроматина, показано, что пики только одного типа значимо ассоциированы с ответом на этилен, а также обогащены последовательностями, узнаваемыми EIN3, по сравнению с пиками других типов.

Ключевые слова: биоинформатика, регуляция транскрипции, TEIL, ETHYLENE-INSENSITIVE3, ChIP-Seq, сайт связывания EIN3, позиционная весовая матрица, генная онтология.

Фитогормон этилен регулирует множество физиологических процессов у растений, включая такие важные характеристики сельскохозяйственных культур как созревание плодов и устойчивость растений к неблагоприятным условиям [1]. Он активирует транскрипционный фактор EIN3 – важнейший регулятор первичного ответа на этилен [2]. EIN3 контролирует экспрессию генов путем связывания со специфической последовательностью в промоторах генов, однако, на реализацию его регуляторной функции могут значительно влиять дополнительные факторы. Мы исследовали возможную роль эпигенетических факторов в функционировании EIN3 посредством биоинформатического анализа публично доступных полногеномных данных *Arabidopsis thaliana*. Анализ данных ChIP-Seq [3] показал, что распределение пиков в промоторах генов является бимодальным с максимумами в районах дистального и проксимального промоторов. Используя полногеномную карту 9 типов хроматина [4], мы классифицировали все пики по эпигенетическому статусу. Пики, относящиеся к дистальному максимуму, оказались ассоциированными со специфическим типом хроматина. Именно относящиеся к этому типу пики ChIP-Seq были значимо ассоциированы с ответом на этилен, а также обогащены последовательностями, узнаваемыми EIN3, по сравнению с пиками других типов. Таким образом, сочетание эпигенетических характеристик хроматина с особенностями нуклеотидного контекста в районе связывания EIN3 может определять различные способы EIN3-зависимой регуляции транскрипции. Работа поддержана грантом РФФИ 15-34-20870.

Литература:
1. *Abeles F.B. et al. Ethylene in plant biology. San Diego: Acad. Press., 1992.*
2. *Merchante C. et al. Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation//Curr. Opin. Plant Biol. 2013. Vol. 16. P. 554-560.*
3. *Chang K.N. et al. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis//Elife. 2013. Vol. 2. P. e00675.*
4. *Sequeira-Mendes J. et al. The functional topography of the Arabidopsis genome is organized in a reduced number of linear motifs of chromatin states//Plant Cell. 2014. Vol. 26. P. 2351–2366.*

UDC 573.7:57.056

БИОИНФОРМАТИКА И IT

STUDY OF THE ROLE OF CHROMATIN LANDSCAPE IN REGULATION OF PRIMARY ETHYLENE RESPONSE IN *ARABIDOPSIS THALIANA* BASED ON THE COMPUTATIONAL ANALYSIS OF WHOLE-GENOME DATA

Zemlyanskaya E.V., Levitsky V.G., Oshchepkov D.Y., Mironova V.V.

The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
630090, Russia, Novosibirsk, Akad. Lavrentiev ave. 10
e-mail: ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

The analysis of ChIP-Seq derived EIN3 binding regions (peaks) in A. thaliana, classified according to the chromatin state, showed that the peaks of only one type were significantly associated with ethylene response, as well as enriched in EIN3 binding sites compared to the peaks of other types.

Key words: bioinformatics, transcriptional regulation, TEIL, ETHYLENE-INSENSITIVE3, ChIP-Seq, EIN3 binding site (EBS), position weight matrix, Gene Ontology.

The plant hormone ethylene regulates numerous physiological processes in plants including significant characteristics of agricultural crops such as fruit ripening rates and plant tolerance to stress conditions [1]. It activates EIN3 transcription factor – a primary transcriptional regulator of ethylene response [2]. EIN3 controls gene expression upon binding to a specific sequence in gene promoters, however, its regulatory function might be considerably affected by additional factors. In this work, we investigate the possible role of epigenetic factors in EIN3 functioning by means of bioinformatics analysis of publicly available whole-genome data in Arabidopsis thaliana. The analysis of ChIP-Seq data on EIN3 binding [3] showed that distribution of peaks in gene promoters was bimodal with maxima in distal and proximal promoter regions. We characterized all peaks with respect to the epigenetic status using genome-wide map of nine chromatin states [4]. The peaks related to distal maximum were found associated with a specific chromatin state. Exactly the peaks corresponding to this chromatin state were significantly associated with ethylene response, as well as they were enriched in specific EIN3 binding sequences compared to the peaks of other types. Thus, the interplay of chromatin landscape and DNA-binding context might cause the distinct modes of EIN3 mediated regulation of gene expression. The study was supported by RFBR 15-34-20870.

References:

1. *Abeles F.B. et al. Ethylene in plant biology. San Diego: Acad. Press., 1992.*
2. *Merchante C. et al. Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation//Curr. Opin. Plant Biol. 2013. Vol. 16. P. 554-560.*
3. *Chang K.N. et al. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis//Elife. 2013. Vol. 2. P. e00675.*
4. *Sequeira-Mendes J. et al. The functional topography of the Arabidopsis genome is organized in a reduced number of linear motifs of chromatin states//Plant Cell. 2014. Vol. 26. P. 2351–2366.*

BIOINFORMATICS AND IT

УДК 577.112.7

РАСПОЗНАВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ СПЕЦИФИЧНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТЕИНКИНАЗ С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ИНГИБИТОРАМИ

Карасев Д.А.[1,2], Веселовский А. В.[1], Лагунин А.А.[1,2], Филимонов Д.А.[1], Соболев Б.Н.[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ),
Россия, Москва
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8
[2] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (РНИМУ),
Россия, Москва
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1
e-mail: w.dmitrykarasev@gmail.com

Для определения аминокислотных остатков ассоциированных с ингибиторной специфичностью протеинкиназ был применен оригинальный алгоритм SPrOS, который основан на оценке локального сходства аминокислотных последовательностей. Верификация результатов с помощью трехмерных комплексов протеинкиназа-ингибитор позволила выяснить роль определенных аминокислотных остатков.

Ключевые слова: протеинкиназы; локальное сходство аминокислотных последовательностей; ингибиторы протеинкиназ.

Определение аминокислотных остатков, влияющих на специфичное связывание белков с низкомолекулярными ингибиторами важно при конструировании лекарств. Селективность ингибитора к белкам-мишеням часто определяется небольшим числом аминокислотных остатков. Возможности определения таких остатков с помощью трехмерного моделирования, часто ограничены в связи с недостатком данных. Возможности методов, основанных на множественном выравнивании, ограничены в случае протеинкиназ, которые характеризуются существенной дивергенцией последовательностей. Чтобы преодолеть эти ограничения, мы применили оригинальный метод SPrOS (Specificity Projection On Sequence), в котором оценки специфичности аминокислотных позиций рассчитываются исходя из сходства их окружения в последовательностях. Мы использовали метод для выявления аминокислотных позиций, связанных с ингибиторной специфичностью протеинкиназ.

Результаты верифицировались по трехмерным структурам комплексов протеинкиназа-ингибитор. При исследовании взаимодействия протеинкиназ с тремя ингибиторами показано, что предсказанные остатки либо контактируют с ингибитором, либо влияют на конформацию лиганд-связывающей области. Исключение близких гомологов тестируемого белка позволило уменьшить число трудно интерпретируемых позиций. Целесообразность этой процедуры определялась соотношением спектра ингибирования с филогенией. Таким образом, была продемонстрирована эффективность предложенного подхода для определения паттернов лигандной специфичности в аминокислотной последовательности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00491-а.

UDC 577.112.7

RECOGNITION OF AMINO ACID RESIDUES CAUSING THE SPECIFIC INTERACTION OF PROTEIN KINASES WITH LOW MOLECULE WEIGHT INHIBITORS

Karasev D.A.[1,2], Veselovsky A.V.[1], Lagunin A.A.[1,2], Filimonov D.A.[1], Sobolev B.N.[1]

[1] Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russian Federation
119121, Moscow, Pogodinskaya Street, 10, building 8
[2] Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russian Federation
117997, Moscow, Ostrovitianov Street, 1
e-mail: w.dmitrykarasev@gmail.com

БИОИНФОРМАТИКА И IT

Original method SPrOS based on local sequence similarity was applied to recognize amino acid residues associated with inhibitory specificity of protein kinases. Validation using 3D complexes of protein kinase-inhibitors allowed explaining the role of recognized amino acid residues.

Key words: protein kinase; local sequence similarity; protein kinase inhibitors.

Recognition of amino acid residues causing specific interaction of proteins with low molecular weight inhibitors is important for drug design. Often, only a small fraction of amino acid residues of the protein determines its inhibitory selectivity. The possibilities of methods based on three-dimensional modeling are limited due to the lack of data. The methods based on multiple sequence alignment can be insufficiently effective in the case of protein kinases, which display the significant sequence divergence. To overcome these limitations, we applied the original method SPrOS, in which estimates of amino acid specificity are calculated from the similarity of their surroundings in sequences. We applied the method to recognize amino acid positions associated with inhibitory specificity of protein kinases.

The results were verified using the 3D structures of protein kinases complexed with inhibitors. The three inhibitors were studied. The predicted residues either contacted with the inhibitor, or altered the conformation of ligand-binding area. Removal of the close homologues of the test protein decreases the number of the ambiguously interpreted positions. The reasonableness of this procedure depended on the relationship between an inhibitory spectrum and phylogenic partition. Thus, our approach demonstrated the efficiency for prediction of the ligand specificity patterns in amino acid sequences of protein kinases.

The study was supported by Grant RFBR No 16-04-00491-a.

УДК 576.3:577:615

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЭФФЕКТОРНОГО ДОМЕНА СМЕРТИ БЕЛКА FADD

Иванисенко Н. В.[1,2], Хиллерт Л.[3], Иванисенко В. А.[1], Лаврик И. Н. [1,3]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия
[3] Факультет прикладных исследований воспалительных процессов, Институт экспериментальной внутренней медицины, Университет Отто фон Гюрике, Магдебург, Германия
e-mail: n.ivanisenko@gmail.com

С использованием методов виртуального скрининга и молекулярного моделирования было проведено предсказание структур соединений и пептидов, направленных на ингибирование белка FADD. Первичный экспериментальный анализ показал, что предсказанные соединения могут являться основой для разработки перспективных ингибиторов программируемой клеточной гибели.

Ключевые слова: виртуальный скрининг; молекулярный докинг; программируемая клеточная гибель; апоптоз.

Рецептор CD95 является одним из наиболее изученных представителей семейства рецепторов смерти. Его активация ведет к запуску апоптоза – программы программируемой клеточной гибели через образование комплекса DISC (Death-Inducing Signaling Complex – комлпекс, индуцирующий смерть). Основным структурным звеном комплекса CD95 DISC является адаптерный белок FADD (Fas-Associated Death Domain – Fas-ассоциированный домен смерти). Олигомеризация этого белка является необходимой для активации прокаспазы-8 в рецепторном комплексе. Особенностью белка FADD является наличие двух доменов: домена смерти и DED домена (Death Effector Domain – эффекторный домен смерти). Связывание DED доменов играет ключевую роль в образовании комплекса с участием прокаспазы-8, 10 и белка cFLIP и является ключевой стадией инициации программируемой клеточной гибели. Нарушение функционирования сигнального пути CD95 ассоциированно с развитием ряда патологий, включая нейродегенеративные заболевания. В связи с этим поиск ингибиторов белка FADD представляет большую практическую ценность. В данной работе был осуществлено предсказание сайтов связывания низко-

BIOINFORMATICS AND IT

молекулярных соединений с DED доменом белка FADD. В результате, с использованием методов виртуального скрининга был проведен поиск in silico малых химических соединений, направленных на взаимодействие с DED доменом белка FADD. В качестве дополнительной стратегии, был проведен дизайн коротких пептидов на основе последовательности белка MUC1, способных связываться с DED доменом белка FADD. Первичный экспериментальный анализ показал, что предсказанные соединения могут являться основой для разработки перспективных ингибиторов программируемой клеточной гибели.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 15-04-08065-А и РНФ № 14-44-00011

UDC 576.3:577:615

IN SILICO DESIGN OF SMALL MOLECULE INHIBITORS OF FADD DEATH EFFECTOR DOMAIN

Ivanisenko N.V.[1,2], L. Hillert[3], Ivanisenko V.A.[1], Lavrik I.N. [1,3]

[1] Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Department of Translational Inflammation, Institute of Experimental Internal Medicine, Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany
e-mail: n.ivanisenko@gmail.com

In silico prediction of potential small molecule FADD inhibitors was carried out using virtual screening and molecular modeling approaches. Preliminary experimental analysis showed that the compounds could be the basis for the development of the promising inhibitors of programmed cell death.

Key words: virtual screening; molecular docking; programmed cell death; apoptosis.

CD95 is one of the best-studied members of the death receptor family. Activation of CD95 leads to the induction of the cell death program, apoptosis, via formation of the death-inducing signaling complex (DISC). Adaptor protein FADD (Fas-Associated Death Domain) is the main structural unit of the CD95 DISC complex. Oligomerization of this protein is necessary for procaspase-8 activation in receptor complex. FADD consists of two domains: Death Domain and Death Effector Domain (DED). Binding of DED domains plays key role in formation of DISC complex by recruiting procaspase-8, 10 and cFLIP representing the key stage of initiation of programmed cell death. Malfunctions of the CD95 signaling pathway is associated with development of a number of pathologies including neurodegenerative diseases. It makes search for inhibitors of FADD protein of great practical value. In this work virtual screening of small molecule compounds of the FADD protein was conducted. As a results a number of potential small molecule inhibitors was selected for predicted binding site. As an additional strategy a design of short peptide FADD inhibitors based on sequence of MUC1 protein was carried out. Preliminary experimental analysis showed that the compounds could be the basis for the future development of potent inhibitors of programmed cell death.

This work was supported by the RFBR project № 15-04-08065-A and RSF project № 14-44-00011

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 577.322

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАЛИЕВОГО КАНАЛА ВХОДЯЩЕГО ВЫПРЯМЛЕНИЯ KIR1.1 С ТЕРТИАПИНОМ

Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Шайтан К.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: alenkavolynceva@gmail.com

БИОИНФОРМАТИКА И IT

Построены структурные модели канала входящего выпрямления Kir1.1 и его комплексов с дикой и мутантными формами тертиапина. Анализ образующихся контактов и энергетических параметров доказал наличие двух вариантов связывания токсина, а также позволил выявить ключевые для взаимодействия остатки.

Ключевые слова: калиевый канал входящего выпрямления Kir1.1, пептидные блокаторы, молекулярное моделирование, молекулярная динамика, структура комплексов.

Калиевые каналы внутреннего выпрямления Kir регулируют множество физиологических процессов, в том числе сердечные функции, обработку болевых синдромов и опиоидного действия, обучение и память, секрецию инсулина и эпителиального транспорта [Hibino и др., 2010; Nichols, Lopatin, 1997]. Нарушения функций Kir каналов сопровождаются развитием разнообразных заболеваний (синдром Барттера при мутации канала Kir1.1). Селективное блокирование Kir каналов имеет большой терапевтический потенциал, для ускорения процесса открытия лекарств может быть использовано молекулярное моделирование.

Единственным описанным пептидом, блокирующим Kir каналы, является выделенный из яда пчелы Apis mellifera тертиапин (TPN) [Jin, Lu, 1998]. Ранее проведенные исследования связывания тертиапина с каналом Kir3.2 [Li, Chen, Chung, 2016] и его устойчивого к окислению мутанта тертиапина-Q с Kir1.1b и Kir2.1 [Hilder, Chung, 2013] выявили две различные модели связывания токсина: за счет Lys 17 и His12 соответственно.

Целью настоящей работы было провести анализ интерфейса связывания TPN и ряда его мутантных форм с каналом Kir1.1. Структурная модель канала входящего выпрямления Kir1.1 была получена методом моделирования по гомологии по шаблону известной структуры канала Kir2.2 (pdb-код 5KUK). Структуры комплексов канала Kir с токсинами TPN, TPN-Q(M13Q), TPN(K17A), TPN(R7A) были получены с помощью молекулярного докинга с помощью web-сервиса HADDOCK 2.2. Структуры комплексов были уравновешены с помощью молекулярно-динамических расчетов, проведенных с использованием программного пакета Gromacs и полноатомного силового поля charmm. Анализ гидрофобных и стекинг-взаимодействий, водородных и ионных связей токсина и калиевого канала производился с помощью программы Platinum и APBS.

Моделирование комплексов калиевого канала Kir1.1 с нативной и мутантными формами токсина TPN позволило получить информацию о структуре образуемых комплексов, а также о контактах, возникающих между каналом и пептидами. Результаты вычислительных экспериментов доказали наличие двух моделей связывания TPN с каналом Kir1.1, а также роль остатков K17 и R7 в образовании комплексов, что согласуется с литературными данными [Hilder, Chung, 2013]. Результаты проведенной работы могут быть использованы для фундаментальных исследований молекулярных основ селективности взаимодействия блокаторов с калиевыми каналами, а также для разработки терапевтических средств.

Литература:

1. *Hibino H. и др. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. // Physiol. Rev. 2010. Т. 90. № 1. С. 291–366.*
2. *Hilder T.A., Chung S.H. Conduction and Block of Inward Rectifier K+ Channels: Predicted Structure of a Potent Blocker of Kir2.1 // Biochemistry. 2013. Т. 52. № 5. С. 967–974.*
3. *Jin W., Lu Z. A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K+ channels. // Biochemistry. 1998. Т. 37. № 38. С. 13291–9.*
4. *Li D., Chen R., Chung S.-H. Molecular dynamics of the honey bee toxin tertiapin binding to Kir3.2 // Biophys. Chem. 2016. Т. 219. С. 43–48.*
5. *Nichols C.G., Lopatin A.N. Inward rectifier potassium channels. // Annu. Rev. Physiol. 1997. Т. 59. С. 171–91.*

BIOINFORMATICS AND IT

UDC 577.322

MOLECULAR MODELING OF INTERACTIONS OF INWARDLY RECTIFYING POTASSIUM CHANNEL KIR1.1 WITH TERTIAPIN

Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119234, Moscow, Leninskiye gory 1-12
e-mail: alenkavolynceva@gmail.com

Structural models of inwardly rectifying potassium channel Kir1.1 and its complexes with wild type and mutant forms of tertiapin was constructed. Analysis of formed contacts and energy parameters proved the existence of two variants of the toxin binding and allowed to identify key residues for the interaction.

Key words: inwardly rectifying potassium channel Kir1.1, peptide blockers, molecular modeling, molecular dynamics, complex structure.

Inwardly rectifying potassium channels regulate many physiological processes, including heart function, treatment of pain and opioid actions, learning and memory, insulin secretion and epithelial transport [Hibino et al., 2010; Nichols, Lopatin, 1997]. Dysfunctions of Kir channels are accompanied by the development of various diseases (e.g., syndrome Bartter in case of mutations of Kir1.1 channel). Selective blocking of Kir channels has great therapeutic potential, molecular modeling can be used to accelerate the drug discovery process.

The only described peptide blocker of Kir channels is tertiapin (TPN), which is isolated from the venom of bee Apis mellifera [Jin, Lu, 1998]. Previous studies of tertiapine binding with Kir3.2 channel [Li, Chen, Chung, 2016], and resistant to oxidation mutant tertiapine-Q with Kir1.1b and Kir2.1 [Hilder, Chung, 2013] revealed two different models of toxin binding: by Lys 17 and His12, respectively.

The aim of this work was to analyze the binding interface of TPN and some of its mutant forms with Kir1.1 channel. The structural model of the inwardly rectifying Kir1.1 channel was obtained by homology modeling on a template of known structure of the channel Kir2.2 (pdb-code 5KUK). Structures of complexes of Kir1.1 channel with toxins TPN, TPN-Q (M13Q), TPN (K17A), TPN (R7A) were obtained by molecular docking using web-server HADDOCK 2.2. The structures of complexes were equilibrated using molecular dynamics calculations performed using the software package Gromacs and all-atoms force field charmm. Analysis of hydrophobic and stacking interactions, hydrogen and ionic bonds of the toxin and the potassium channel was performed using program Platinum and APBS.

Modeling of complexes of the Kir1.1 channels with wild and mutant forms of tertiapin allowed to obtain information about the structure of formed complexes and the contacts aroused between the channel and peptides. The results of computational experiments have shown the presence of two binding models of TPN with Kir1.1 channel, and the role of K17 and R7 residues in the formation of complexes, which is consistent with the literature data [Hilder, the Chung, 2013]. The results of this work may be used for fundamental studies of the molecular basis of selectivity of interaction of blockers with potassium channels, as well as for developing therapeutic agents.

References:

1. *Hibino H. et al. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. // Physiol. Rev. 2010. T. 90. № 1. C. 291–366.*
2. *Hilder T.A., Chung S.H. Conduction and Block of Inward Rectifier K+ Channels: Predicted Structure of a Potent Blocker of Kir2.1 // Biochemistry. 2013. T. 52. № 5. C. 967–974.*
4. *Jin W., Lu Z. A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K+ channels. // Biochemistry. 1998. T. 37. № 38. C. 13291–9.*
5. *Li D., Chen R., Chung S.-H. Molecular dynamics of the honey bee toxin tertiapin binding to Kir3.2 // Biophys. Chem. 2016. T. 219. C. 43–48.*
6. *Nichols C.G., Lopatin A.N. Inward rectifier potassium channels. // Annu. Rev. Physiol. 1997. T. 59. C. 171–91.*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

УДК 579.25+519.688

МЕТОДИКА ПОИСКА НОСИТЕЛЕЙ ГЕНОВ С РАЗЛИЧНЫМ ФУНКЦИОНАЛОМ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ

Самойлов А. Е.[1], Манолов А.И.[1], Ракитина Д.В.[1], Григорьева Т.В.[2], Ильина Е.Н.[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1А
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».
420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.
e-mail: andrei.samoilov@gmail.com

Предложена методика выявления представителей микробных сообществ, обладающих определёнными генами. Методика опробована на сиквенсах образцов кишечного метагенома пациентов с болезнью Крона (для обнаружения бактерий, обладающих генами утилизации пропандиола) и метагеномах образцов промышленного углеводородного шлама (для поиска бактерий со способностью к утилизации нафталина).

Ключевые слова: кишечная микробиота, гены, болезнь Крона, промышленные отходы.

Микробные сообщества представляют собой многокомпонентные системы со сложными метаболическими путями. Главными особенностями микробиоты являются разнообразие её состава и изменчивость бактериального генома, из-за чего в микробных сообществах может присутствовать не только различное количество видов организмов, но и несколько штаммов одного вида, обладающих различными свойствами и принимающих участие в различных метаболических путях. Данные обстоятельства обуславливают необходимость осуществления на генном уровне поиска таксономического состава участников определённого метаболического пути.

Для решения указанной задачи была разработана следующая методика обработки данных: сиквенсы метагеномов собирали с помощью сборщика SPAdes 3.9, на метагеномные сборки выравнивали аминокислотные последовательности генов интереса с помощью tblastn, полученные результаты фильтровали по идентичности (не менее 60%) и по длине выравнивания, которая должна была составлять суммарно не менее 80% от длины гена. Для последовательностей сборки, выравнивание на которые соответствовало указанным критериям, устанавливали таксономический состав методом LCA с помощью ПО MEGAN 5. После проведения указанных шагов строили таблицы с указанием генов интереса, найденных в представителях различных таксонов.

Вышеописанный алгоритм был опробован на двух наборах данных. В качестве первого набора были взяты данные шотган-секвенирования кишечной микробиоты 11 пациентов с болезнью Крона. При данном заболевании нарушается целостность покрывающего клетки кишечного эпителия муцина [1], продуктом метаболизма которого является пропандиол. Генами интереса для нас являлись белки, участвующие в утилизации пропандиола, так как ранее было показано, что они перепредставлены в геномах E.coli, изолированных из содержимого кишечника пациентов с болезнью Крона [2]. После осуществления анализа вышеописанным образом было показано, что в двух из 11 образцов метагеномов присутствует бактерия вида Fusobacteruim ulcerans, также обладающая опероном утилизации пропандиола.

Другим набором данных, на котором был опробован описанный алгоритм, были три сиквенса взятых на различной глубине образцов промышленного углеводородного шлама. Данная среда содержит значительное количество различных углеводородных соединений, включая ароматические, переработка которых является важной экологической задачей. Генами интереса являлись гены оперона утилизации нафталина. Применение описанного алгоритма данных показало наличие данных генов у бактерий группы Pseudomonas stutzeri, видов Arthrobacter phenanthrenivorans, Polaromonas naphthalenivorans и Burkholderia multivorans, рода Pseudomonas и отряда Burkholderiales, а также в одной последовательности некультивируемой бактерии.

Предложенный алгоритм является методом для поиска участников метаболических процессов в метагеномных сообществах по присутствию в их геномах определённых генов. Применимость алгоритма была продемонстрирована на двух независимых наборах данных.

Работа поддержана грантом РНФ 16-15-00258 «E. coli как мишень терапии при болезни Крона».

BIOINFORMATICS AND IT

Литература:
1. *Antoni L. et al. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease //World J Gastroenterol. – 2014. – T. 20. – №. 5. – C. 1165-1179.*
2. *Dogan B. et al. Inflammation-associated adherent-invasive Escherichia coli are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation //Inflammatory bowel diseases. – 2014. – T. 20. – №. 11. – C. 1919-1932.*

UDC 579.25+519.688

SEARCH FOR CARRIERS OF GENES WITH DIFFERENT FUNCTIONS IN MICROBIOTA

Samoilov A.E.[1], Manolov A.I.[1], Rakitina D. V.[1], Griroryeva T.V.[2], Ilyina E.N. [1]

[1] Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia
119435, Mostow, Malaya Pirogovstaya st., 1A
[2] Kazan (Volga region) Federal University, Kazan University, KFU
420008, Russia, Kazan, Kremlyovskaya st, 18
e-mail: andrei.samoilov@gmail.com

We suggest a method of search for bacteria which carry genes of interest in microbiota. This method was tested on gut metagenome sequences obtained from patients with Crohn's disease to reveal bacteria with ability to utilize propanediol and several samples of oil sludge to find bacteria with ability to utilize naphthalene.

Key words: gut microbiota, genes, Crohn's disease, oil sludge.

Microbiota is a multi-component system with complex metabolic pathways. Two characteristic properties of microbiota are diversity of its composition and variability of bacterial genome, therefore microbial communities can contain not only different number of species, but several strains of one species with different properties which take part in different metabolic pathways. Complexity of microbiota makes necessary to perform a taxonomic analysis of pathways on a gene level.

We have devised a pipeline to solve aforementioned problem. Firstly, metagenome sequences were assembled with SPAdes 3.9 assembler. Secondly, amino-acid sequences of genes of interest were aligned to metagenome assemblies with tblastn. Blast hits were filtered and only those with identity more than 60% and alignment length no less than 80% of gene sequence were retained. Lastly, taxonomic analysis of metagenome assembly sequences with tblastn hits fulfilling filtering conditions was obtained usnig MEGAN 5. Results were presented in a form of a table with lists of gene of interest found in different taxa.

Our algorithm was tested on two independent datasets. First dataset consisted of 11 sequences of gut microbiota obtained from patients with Crohn's disease, during which, among many other symptoms, intestinal mucus layer is disrupted [1]. One of the products of mucus degradation is propanediol and genes which utilize it are overrepresented in genomes of E.coli isolated from gut microbiota of patients with Crohn's disease [2]. After applying our pipeline to 11 metagenome sequences we have found evidence that at least two samples contained species Fusobacteruim ulcerans, which also possess propanediol utilization operon.

Another dataset we applied our pipeline to consisted of three sequences of oil sludge metagenome obtained at different depths. This environment consists of different organic compounds including aromatic molecules, disposal of which provides to be an important ecological issue. Genes of interest in this case were genes of naphthalene utilization. Our algorithm showed that these genes are presented in bacteria of Pseudomonas stutzeri group, Arthrobacter phenanthrenivorans, Polaromonas naphthalenivorans, and Burkholderia multivorans species, Pseudomonas genus and order Burkholderiales, and also in one sequence of uncultured bacteria.

The algorithm we present is a method of taxonomic analysis of bacteria which take part in certain pathway in microbiota. We have tested this algorithm on two independent datasets.

The research was supported of RSF grant № 16-15-00258.

References:
1. *Antoni, Lena, et al. «Intestinal barrier in inflammatory bowel disease.» World J Gastroenterol 20.5 (2014): 1165-1179.*
2. *Dogan, Belgin, et al. «Inflammation-associated adherent-invasive Escherichia coli are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation.» Inflammatory bowel diseases 20.11 (2014): 1919-1932.*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

УДК 575.1

ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ГЕНЕТИКИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА: ИНТЕГРАЦИЯ ДАННЫХ ПО GWAS, eQTL И ПОПУЛЯЦИОННЫМ ЧАСТОТАМ SNP

Быкадоров П.А., Опарина Н.Ю. , Фридман М.В., Макеев В.Ю.

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва, Россия
119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3
e-mail: platon.work@gmail.com

Среди генов, на экспрессию которых влияют локусы, ассоциированные с рассеянным склерозом (РС), перепредставлены гены HLA, связанные с процессингом и презентацией антигена с участием MHCI. Мы предлагаем возможный механизм их активации. Локус, в наибольшей степени представленный в результатах GWAS, и влияющий на экспрессию HLA, содержит SNP, частота которых сильно повышена для европейских популяций.

Ключевые слова: multiple sclerosis, GWAS, eQTL, MHC II, IgG, SNP.

Мы создали выборку локусов, предположительно обогащённых SNP, которые функционально значимы для развития РС. Сначала мы создали два списка SNP – статистически ассоциированных и неассоциированных с развитием РС по данным всех GWAS для этого заболевания. Мы добавили к нашим спискам SNP, сцепленные с «хорошими» SNP и убрали из него SNP, сцепленные с «плохими». Далее мы выбрали для отдельных списков SNP, сцепленные сразу с двумя или тремя SNP, статистически ассоциированными с РС по данным всей совокупности GWAS. Для этих целей был написан ряд программ.

SNP из нашего списка являлись как локальными, так и нелокальными eQTL для ряда генов, экспрессирующихся в крови и в нервной системе. Мы исключили из анализа данные по 6-й хромосоме в силу очень значительного влияния самого локуса HLA на развитие аутоиммунных заболеваний. Мы составили список генов, экспрессия которых находится под соответствующим влиянием, и проанализировали его обогащённость с точки зрения GO функций и путей. Мы обнаружили, что для обеих тканей перепредставлена такая функция, как процессинг и презентация антигена с участием MHC II, а также родственные ей. Список SNP, сцепленных с тремя «хорошими» SNP, содержал eQTL для всех перепредставленных функций. Эти SNP были расположены в пределах короткого локуса на 14 хромосоме, предположительно содержащего ген IGHG3.

Как известно, РС характерен почти исключительно для европеоидов. 8 SNP из этого короткого локуса (66 SNP) очень часты у европейцев (>0,3) и весьма редки у африканцев и азиатов (<0,03). При этом в выборке 18 299 «плохих» SNP и сцепленных с ними только 13 SNP с этими свойствами. В выборке 7 524 «хороших» SNP и сцепленных с ними только 14 SNP с этими свойствами.

Мы предполагаем, что IgG стимулирует презентацию антигена за счёт взаимодействия с FcRγ-рецепторами (1), за счёт чего происходит активация Т-хелперов презентируемым антигенным комплексом и последующая стимуляция вторичного иммунного ответа В-клеток с синтезом IgG. Часть этих процессов может происходить за гемато-энцефалическим барьером, на что косвенно указывает сходство результатов по eQTL в крови и в нервной системе. На это же указывает влияние соответствующего локус на IgG-индекс (отношение концентрации IgG в цереброспинальной жидкости и в сыворотке по сравнению с таким же отношением для альбумина) (2, 3).

SNP соответствующего локуса влияют на экспрессию в крови и в нервной системе генов HLA-DOB, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB1. Известно, что протективный аллель HLA-DQB1 при РС влияет на презентацию основного белка миелина, наиболее значимого для развития РС, не влияя в той же мере на презентацию других белков (4).

Таким образом, сочетанный анализ данных GWAS и eQTL позволяет выделить локусы, для которых высоко вероятна функциональная связь с заболеванием и сделать предположения о характере их влияния. Для заболеваний, частота которых сильно различается в различных популяциях, может быть важна также информация об относительной частоте разных SNP в этих популяциях.

Литература:

1. Getahun A. Heyman B. IgG- and IgE-mediated antigen presentation on MHC class II.//Immunol. Lett. 2004, V.92, № 1-2, P.33-38.
2. Goris A., Pauwels I., Gustavsen M.W. et al. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in

BIOINFORMATICS AND IT

multiple sclerosis.//Brain. 2015, V. 138, Pt 3, P. 632-643.
3. *Buck D., Albrecht E., Aslam M. et al. Genetic variants in the immunoglobulin heavy chain locus are associated with the IgG index in multiple sclerosis.//Ann.Neurol. 2013, V.73, № 1, P.86-94.*
4. *Kumar A., Melis P., Genna V., et al. Antigenic peptide molecular recognition by the DRB1-DQB1 haplotype modulates multiple sclerosis susceptibility.//Mol.Biosyst. 2014, V.10, № 8, P. 2043-2054.*

UDC 575.1

APPROACHES TO THE GENETICS OF MULTIPLE SCLEROSIS STUDING: INTEGRATION OF GWAS, eQTL AND SNPS POPULATION FREQUENCY DATA

Bykadorov P.A., Oparina N.J. , Fridman M.V., Makeev V.J.

Vavilov Institute of General Genetics, RAS
119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3
e-mail: platon.work@gmail.com

Among the genes which expression are affected by the loci associated with multiple sclerosis (MS), overrepresented genes are associated with antigen processing and presentation with MHC II. First of all these are the HLA genes. We propose a possible mechanism of their activation. Locus, best represented in the results of GWAS and strongly influences the expression of HLA contains SNPs, the frequency of which increased sharply for the European population.

Ключевые слова: multiple sclerosis, GWAS, eQTL, MHC II, IgG, SNP

We generated a set of loci presumably enriched with SNPs that have a functionally significance for the development of the MS. Firstly we created two lists of the SNP, statistically associated and non-associated with the development of MS according to all GWAS data. We added to our set SNPs, that have a linkage with «good» SNP and deleted SNPs, that have a linkage with «bad». Than we picked out SNPs, that was linked with two or three SNPs, statistically associated with MS according to all GWAS data set. We generated some original tools for this purpose.

SNPs from our lists were local or distant eQTLs for some genes expressed in blood and nervous system. We exclude data for 6 chromosome because of very strong influence on autoimmune diseases HLA itself. We created the lists of these genes and analyzed their enrichment for GO functions and pathways. We discovered that antigen processing and presentation with MHC II (and related functions) was overrepresented for both tissue. The list for SNPs linked with three «good» SNPs, contained eQTLs for all overrepresented functions. This is a short locus on 14 chromosome, presumably containing IGHG gene.

As known, MS occurs almost exclusively in Caucasians. 8 SNPs from this short locus (66 SNPs) are very frequent for Europeans (>0,3) and very rare for Africans and Asians (<0,03). There are only 13 SNPs with such features among 18 299 «bad» and linking with «bad» SNPs. There are 14 SNPs in initial sample of 7 524 «good» and linked with «good» SNPs.

We proposed that IgG increases antigen presentation by interacting with FcRγ-receptors (1), and then due to the activation of T-helper cells of presenting antigenic complex they stimulates a secondary immune response of B cells to IgG synthesis. Some of these processes may occur subdurally on which indirectly indicates the similarity in results for eQTL in blood and nervous system. This is also supported by the effect of said corresponding locus on IgG index (ratio of concentrations of IgG in cerebrospinal fluid and serum as compared with the same ratio for albumin) (2, 3).

SNPs of our locus affect expression in blood and nervous system genes HLA-DOB, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB1. It is shown that a protective allele HLA II DQB1 in MS has specific impact on the presentation of myelin basic protein, the most significant for the development of the MS, without causing an equally significant impact on other proteins (4).

Thus, the joint analysis and GWAS and eQTL data allows us to select the loci with a high probability of functional association with the disease, as well as to make assumptions about the nature of their influence. For diseases, the frequency of which differs in different populations, the information about relative frequency of different SNPs in these populations is also important.

References:
1. *Getahun A. Heyman B. IgG- and IgE-mediated antigen presentation on MHC class II.//Immunol. Lett. 2004, V.92, № 1-2, P.33-38.*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

2. Goris A., Pauwels I., Gustavsen M.W. et al. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis.//Brain. 2015, V. 138, Pt 3, P. 632-643.
3. Buck D., Albrecht E., Aslam M. et al. Genetic variants in the immunoglobulin heavy chain locus are associated with the IgG index in multiple sclerosis.//Ann.Neurol. 2013, V.73, № 1, P.86-94.
4. Kumar A., Melis P., Genna V., et al. Antigenic peptide molecular recognition by the DRB1-DQB1 haplotype modulates multiple sclerosis susceptibility.//Mol.Biosyst. 2014, V.10, № 8, P. 2043-2054.

УДК 612.825

СПЕКТРАЛЬНО-ВОЛНОВАЯ МОДЕЛЬ ВИСЦЕРАЛЬНОГО МОЗГА И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ ТРАНСКРИПЦИИ НА МОЛЕКУЛЯРНЫЙ УРОВЕНЬ

Шабанов Г.А., Максимов А.Л., Рыбченко А.А.

Научно-исследовательский центр «Арктика» ДВО РАН, Магадан, Россия
690018, Владивосток, Вострецова, 6А, кв. 4.
e-mail: neurokib@mail.ru

На организменном уровне разработана спектральная матрица (висцером), отражающая множество функциональных состояний эффекторов - “multiple arousal”. Обсуждается возможность транскрипции подобных матриц.

Ключевые слова: висцером, клеточный уровень, подобная спектральная матрица.

В 1944-1950 годах физик Е.К. Завойский и Л.А. Блюменфельд заложили основы электронного парамагнитного резонанса, при котором макромолекулы ДНК, помещенные в постоянное магнитное поле, способны избирательно поглощать энергию электромагнитного поля. Важнейшей задачей остается поиск возможностей соотнесения резонансной частоты поглощения с функцией отдельных участков (генов) ДНК. Проводя спектральный анализ биоэлектрической активности головного мозга с высоким разрешением, удалось смоделировать активирующую систему в виде скопления осциллирующих элементов как спектральную матрицу – «висцером» [1]. Частотное поле «висцером» состоит из 8400 спектральных ячеек, организованных в 7 октав в полосе от 0,1 до 27 Гц. В процессе исследований на человеке нами был обнаружен фундаментальный факт – если организм поместить в постоянное магнитное поле и воздействовать на клеточный уровень слабым пульсирующим магнитным полем с частотой до сотен гГц, то через время Ti произойдет выраженная реакция одной из частотных ячеек висцерома на организменном уровне в герцовом диапазоне. Такой подход позволил трансформировать спектральную матрицу «висцером» организменного уровня на новую матрицу макромалекул клеточного уровня. Сформулированы основные принципы такого «подобного» преобразования. Изучены подходы к частотно-резонансным способам управления функцией отдельных белков.

Литература:
1. *Г.А.Шабанов, А.Л.Максимов, А.А. Рыбченко. Функционально топическая диагностика организма человека на основе анализа ритмической активности головного мозга. – Владивосток: Дальнаука, 2011. – 206 с.*

UDC 612.825

SPECTRAL-WAVE MODEL OF VISCERAL BRAIN AND POSSIBILITIES OF ITS TRANSCRIPTING ONTO THE MOLECULAR LEVEL

G.A. Shabanov, A.L. Maksimov, A.A. Rybchenko

Scientific Research Center “Arktika” FEB RAS, Magadan, Russia
App. 4, 6-A Vostretsov Street, Vladivostok, 690018.
e-mail: neurokib@mail.ru

A spectral matrix (viscerom) that reflects a variety of functional states of effectors – “a multiple arousal” was developed on the organismic level. A possibility of transcription by a similarity principle and creation of a spectral matrix on the cellular level is being discussed.

BIOINFORMATICS AND IT

Key words: viscerom, cellular level, similar spectral matrix.

In 1944-1950 physicists E.K. Zavoyskiy and L.A. Blyumenfel'd laid the foundation for electronic paramagnetic resonance at which DNA macromolecules placed into the flat magnetic field were able to selectively absorb the electromagnetic field energy. An important task has been a search for possibilities of matching of resonance frequency of absorption to the function of certain DNA areas (genes). When carrying the high resolution spectral analysis of the brain bioelectric activity, we were able to model an activating system in the form of a cluster of oscillating elements as a spectral matrix – "viscerom" [1]. The "viscerom" frequency field consists of 8400 cells organized in seven octaves in the bandwidth of 0.1–27 Hz. During our studies on humans we found a fundamental fact: if to place an organism into the flat magnetic field and to affect the cellular level by applying a weak pulsing magnetic field of the frequency up to hundreds of Hz, then in time Ti an expressed reaction of one of the "viscerom" frequency cells occurs on the organismic level in the Hz range. Such approach has allowed to transcript the organismic level spectral matrix (viscerom) onto a new matrix of macromolecules of the cellular level. We have also defined the main fundamentals of such "similar" transcription. Approaches to frequency-resonance ways of managing some proteins' functions have been explored.

References:
1. G.A. Shabanov, A.L. Maksimov, A.A. Rybchenko. Functional and topical diagnostics of a human organism based on analysis of the brain rhythmic activity. – Vladivostok: Dal'nauka, 2011. – 206 p.

УДК 577.212.2

КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ НУКЛЕОСОМ

Суворова Ю.М, Коротков Е.В.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Институт Биоинженерии, Москва, Россия.
117312 Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп.1
e-mail: suvorovay@gmail.com

Известно, что большая часть генома находится в составе нуклеосом и показано что в расстановке нуклеосом играет роль и сама последовательность ДНК. В данной работе проведен кластерный анализ 67517 последовательностей генома S. Cerevisiae. Было обнаружено 135 значимых кластеров, которые содержат 43225 последовательностей исходной выборки.

Ключевые слова: кластерный анализ, последовательности связывания нуклеосом, S. cerevisiae.

Известно, что в клеточном ядре последовательности ДНК упакованы в компактные структуры. Первым уровнем такой упаковки является накручивание ДНК на белковый октамер с образованием нуклеосом. Всего до 80% генома может находиться в составе нуклеосом. Было показано что расположение нуклеосом помимо упаковки имеет и регуляторную функцию. Гипотеза о том, что расположение нуклеосом в геноме определяется нуклеотидной последовательностью, была выдвинута Э.Трифоновым еще в 1980 году [1]. С тех пор большое число исследований было посвящено поиску свойств последовательностей, которые отличали бы эти участки, а также разработке методов предсказания позиций нуклеосом *in silico* [2]. В данной работе мы провели кластерный анализ для исследования разнообразия последовательностей ДНК, с которыми связываются нуклеосомы, генома дрожжей S. cerevisiae.

Всего 67517 уникальных участков связывания нуклеосом в соответствии с экспериментальной картой [3] были вырезаны из генома *S. cerevisiae*. Чтобы привести все последовательности к одинаковой длине, мы обрезали все участки до 140 нуклеотидов, выровняв их по центру. Предварительный анализ был проведен сканированием последовательностей программой BLAST. В результате было найдено 320 случаев значимого подобия последовательностей внутри множества (e-value < 1e-5).

Для кластеризации каждая последовательность переводилась в 16-символьный динуклеотидный алфавит. Далее последовательности группировались с использованием самообучающихся позиционно-весовых матриц размерностью 16 на 70 и имитационного моделирования методом Монте-Карло.

Анализ случайных (перемешанных) последовательностей того же объема показал, что статистически значимым является размер группы больше 80 последовательностей. Среди реальных данных было най-

БИОИНФОРМАТИКА И IT

дено 135 непересекающихся значимых кластеров, которые вмещают в себя 43225 последовательностей исходной выборки (средний размер класса составил 400 последовательностей). Полученные результаты показывают, что существует «размытое» подобие между последовательностями связывания нуклеосом. Полученные группы в настоящее время используются для предсказания районов связывания нуклеосом в различных геномах.

Литература:
1. *Trifonov EN. Sequence-dependent deformational anisotropy of chromatin DNA. // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8 №17. P. 4041-54.*
2. *Teif VB. Nucleosome positioning: resources and tools online. // Brief. Bioinform. 2015. №26 bbv086*
3. *Brogaard K, Xi L, Wang JP, Widom J. A base pair resolution map of nucleosome positions in yeast // Nature. Vol. 486 № 7404. P. 496–501.*

UDC 577.212.2

CLUSTER ANALYSIS OF NUCLEOSOME BINDING SITES

Suvorova Y.M., Korotkov E.V.

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Institute of Bioengineering, Moscow, Russian Federation
117312 Moscow, 60 let Oktjabrja pr-t, 7, bld. 1
e-mail: suvorovay@gmail.com

It is well known that most of the eukaryotic genome is wrapped into nucleosomes and it was shown that DNA sequence itself plays an important role in the nucleosome positioning. In this work, we performed cluster analysis of 67 517 nucleosome binding sequences from the S. Cerevisiae genome. We found 135 statistically significant classes that contain 43225 sequences from the original set.

Key words: nucleosome binding sites, cluster analysis, *S. Cerevisiae*

In eukaryotic organisms, most of the DNA (about 80%) is wrapped around histone octamers and formed nucleosomes that are the basic units of higher-order chromosome structure. It was shown that besides packaging nucleosomes positioning has a regulatory function too. The hypothesis that the nucleosomes positioning in the genome may be determined by the DNA sequence, was first put forward by E.Trifonov in 1980 [1]. Since then, there were a lot of research devoted to the search of properties of sequences that would distinguish these areas, as well as developing methods for nucleosomes positioning prediction [2]. In this work, we performed a cluster analysis of the *S. cerevisiae* nucleosome binding sites to investigate the diversity of the corresponding DNA sequences.

We extract 67517 unique nucleosome binding sequences from the *S. cerevisiae* genome using coordinates of the experimental map [3]. To bring all the sequences to the same length, we cut all center-alligned nucleosome sequences up to 140 nucleotides. Within this dataset we performed all-against-all sequence comparison using blast and found only 320 cases of significant sequence similarity (e-value < 1e-5).

For further analysis, we transform each DNA sequence into 16-letter dinucleotide alphabet sequence (of length 70). The clusterization procedure was based on the self-learning 16×70 position-weight matrices and the Monte-Carlo simulation.

Random sequence analysis of the same volume dataset showed that statistically significant group size must exceed 80 sequences. Among the real data we found 135 significant non-overlapping clusters that together comprise 43225 sequences from the original dataset (the average class size - 400 sequences). The results show that there is a hidden similarity between nucleosome binding sequences. Found classes are used for prediction nucleosome binding regions in different genomes.

References:
1. *Trifonov EN. Sequence-dependent deformational anisotropy of chromatin DNA. // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8 №17. P. 4041-54.*
2. *Teif VB. Nucleosome positioning: resources and tools online. // Brief. Bioinform. 2015. №26 bbv086*
3. *Brogaard K, Xi L, Wang JP, Widom J. A base pair resolution map of nucleosome positions in yeast // Nature. Vol. 486 № 7404. P. 496–501.*

УДК 577.21

СВОЙСТВА САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA В mRNA ГЕНА ТИТИНА ЧЕЛОВЕКА

Пинский И.В., Ниязова Р.Е., Иващенко А.Т.

Казахский национальный университет им.аль_Фараби, Алматы, Казахстан
050038, Алматы, пр.аль-Фараби, 71,
e-mail: a.iavashchenko@gmail.com

Из 6265 miRNA человека с mRNA гена титина связывались 18 miRNA. miR-14-24215-3p и miR-6861-5p имели по три сайта связывания, а остальные miRNA по одному сайту связывания. Только miR-6861-5p связывалась с mRNA без образования «пузыря» в двухцепочечной структуре комплекса.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, титин, сердечно-сосудистые заболевания

Белок мышечной ткани человека титин является самым большим в природе и играет важную роль в обеспечении эластичности и структурной целостности саркомеров. Самая длинная изоформа титина состоит из 35991 аминокислоты. Нарушение синтеза титина приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний: сердечная недостаточность, кардиомиопатия, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда и т.д. Изоформы титина синтезируются в разных типах мышечной ткани, а кодирующие их mRNA состоят из разного набора экзонов. Взаимодействие miRNA с mRNA гена человеческого титина не было изучено, поэтому было важно выяснить, какие miRNA могут иметь сайты связывания в mRNA этого гена.

Программма MirTarget определяет следующие свойства связывания: стартовые позиции сайтов связывания miRNA в mRNA; локализацию этих сайтов в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA; свободную энергию гибридизации ΔG (kJ/mole); отношение ΔG/ΔGm (%) было определено для каждого сайта (ΔGm равняется свободной энергии связывания miRNA с совершенно комплементарной нуклеотидной последовательностью); схемы нуклеотидных взаимодействий miRNA и mRNA [1].

Из 2564 miRNA, имеющихся в miRBase (*www.mirbase.org/*), и 3701 новых miRNA [2] нами выявлено 18 miRNA, которые имеют сайты связывания по всей длине mRNA гена титина (таблица). miR-14-24215-3p и miR-6861-5p имели по три сайта связывания, а остальные miRNA по одному сайту. Начала сайтов связывания miR-14-24215-3p и miR-6861-5p отличались на 79 нуклеотидов. Расстояние между стартовыми позициями сайтов связывания каждой из этих двух miRNA составляло 753 нуклеотида, то есть они находились в одной открытой рамке считывания. На схемах взаимодействия miRNA с mRNA только miR-6861-5p связывалась с mRNA без образования «пузыря» в двухцепочечной структуре комплекса. Поскольку miR-14-24215-3p и miR-6861-5p имеют по три сайта связывания, то они с большей вероятностью могут связываться с mRNA гена титина.

Таблица *– Характеристики сайтов связывания miRNA с mRNA гена титина*

miRNA	Start of sites, nt	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt
miR-494-5p	1301	-108	90	23
miR-578	1960	-98	90	21
miR-19-36945-3p	3271	-102	92	20
miR-1-1585-3p	8609	-96	92	21
miR-374b-3p	17239	-98	90	22
miR-374c-3p	17241	-98	90	22
miR-11-28905-3p	17446	-117	89	23
miR-3714	17450	-110	90	22
miR-34a-3p	22116	-104	91	22

БИОИНФОРМАТИКА И IT

miRNA	Start of sites, nt	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt
miR-1278	24928	-98	90	22
miR-544b	26044	-104	93	22
miR-14-24215-3p	37245	-104	93	22
miR-6861-5p	37324	-115	92	22
miR-14-24215-3p	37998	-102	91	22
miR-6861-5p	38077	-115	92	22
miR-14-24215-3p	38751	-104	93	22
miR-6861-5p	38830	-115	92	22
miR-136-3p	71469	-102	91	22
miR-12-32366-3p	71984	-108	90	22
miR-4738-3p	74955	-113	93	22
miR-4693-5p	92464	-108	94	23
miR-4495	93909	-93	90	21

Литература:
1. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformation. 2014. Vol. 10. N 7. P. 423-427.*
2. *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

FEATURES OF miRNA BINDING SITES IN THE mRNA OF HUMAN TITIN GENE

Pinsky I.V., Niyazova R.E., Ivashchenko A.T.

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
050038, Almaty, al-Farabi street, 71,
e-mail: a.iavashchenko@gmail.com

Only 18 miRNA among 6271 human miRNAs bound with mRNA of human titin gene. miR-14-24215-3p and miR-6861-5p had three binding sites each and the rest miRNAs had one site each. Only miR-6861-5p bound with mRNA without formation of “bubble” in double-stranded structure of complex.

Key words: miRNA, mRNA, titin, cardiovascular diseases

Titin is a protein of human muscle tissue. It is the largest protein in the nature and plays enormous role in providing elasticity and structural integrity of sarcomers. It’s longest IC isoform consists of 35991 aminoacids and mRNA of this isoform includes all 363 exons of this gene. Defects of titin synthesis causes to the development of serious cardiovascular diseases such as dillated cardiomyopathy, heart failure, coronary heart disease (CHD), myocardial infarction and etc. Different titin isoforms synthesizes in various types of muscle tissue (heart and sceletal striated musle tissue) and are encoded by different combinations of exons. The interaction between miRNAs and mRNAs of human titin gene was not studied so it was important to study which miRNAs have binding sites in mRNAs of this gene and which exons contain these sites.

The MirTarget program defines the following features of binding: the start of the initiation of miRNA binding with mRNAs; the localization of miRNA binding sites in the 5’UTRs, CDSs and 3’UTRs of the mRNAs; the free energy of hybridization ΔG (kJ/mole); the ratio ΔG/ΔGm (%) was determined for each site (ΔGm equals the free energy of miRNA binding with its perfect complementary nucleotide sequence); the schemes of nucleotide interactions between the miRNAs and the mRNAs [1].

There were identified only 18 miRNAs, that have binding sites along all length of human titin gene (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/*), among 2564 miRNAs from the miRBase (*www.mirbase.org/*) and 3707 novel miRNAs [2] (the table). miR-14-24215-3p и miR-6861-5p had three binding sites each and the rest miRNAs had one site each. Start

BIOINFORMATICS AND IT

positions of miR-14-24215-3p and miR-6861-5p binding sites differed on 79 nucleotides. The distance between start positions of binding sites of each miRNA (miR-14-24215-3p and miR-6861-5p) was equal 753 nucleotides. It means that these sites were located in one open reading frame. On the schemes of miRNA-mRNA interaction only miR-6861-5p bound with mRNA without formation a "bubble" in double-stranded structure of complex. Since miR-14-24215-3p and miR-6861-5p have three binding sites each they can bind with mRNA of titin with higher relativity than other miRNAs.

The table *- Characteristics of the miRNA binding sites in the mRNA of human titin gene*

miRNA	Start of sites, nt	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt
miR-494-5p	1301	-108	90	23
miR-578	1960	-98	90	21
miR-19-36945-3p	3271	-102	92	20
miR-1-1585-3p	8609	-96	92	21
miR-374b-3p	17239	-98	90	22
miR-374c-3p	17241	-98	90	22
miR-11-28905-3p	17446	-117	89	23
miR-3714	17450	-110	90	22
miR-34a-3p	22116	-104	91	22
miR-1278	24928	-98	90	22
miR-544b	26044	-104	93	22
miR-14-24215-3p	37245	-104	93	22
miR-6861-5p	37324	-115	92	22
miR-14-24215-3p	37998	-102	91	22
miR-6861-5p	38077	-115	92	22
miR-14-24215-3p	38751	-104	93	22
miR-6861-5p	38830	-115	92	22
miR-136-3p	71469	-102	91	22
miR-12-32366-3p	71984	-108	90	22
miR-4738-3p	74955	-113	93	22
miR-4693-5p	92464	-108	94	23
miR-4495	93909	-93	90	21

References:
1. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformation. 2014. Vol. 10. № 7. P. 423-427.*
2. *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.*

УДК 577.21

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ miRNA С mRNA НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ПРИ РАЗВИТИИ РАКА ЖЕЛУДКА

Акимниязова А.Н., Ниязова Р.Е., Атамбаева Ш.А.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан
050038, Алматы, пр. аль-Фараби, 71
e-mail: atambayevashara@gmail.com

Установлены сайты связывания miRNA с mRNA генов, которые являются ключевыми участниками рака желудка. Выявлены сайты связывания с высокой энергией гибридизации, которые расположены в 5'UTR,

БИОИНФОРМАТИКА И IT

CDS и 3'UTR mRNA этих генов. Найдено четыре miRNA сайтов связывания с полной комплементарностью. Результаты исследования являются полезными для разработки методов ранней диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, рак желудка.

Важную роль в регуляции онкогенов играют miRNA. Во всем мире разрабатываются молекулярные не инвазивные методы ранней диагностики рака желудка на основе анализа в крови изменений концентрации метаболитов, белков, ДНК, miRNA и др. Предсказание сайтов связывания miRNA и поиск их в mRNA онкогенов необходимы для разработке методов ранней диагностики онкологических заболеваний.

Для данной работы были созданы базы данных по генам участвующих в развитии рака желудка и база данных по микроРНК. В качестве мишеней для miRNA были изучены гены, белки которых участвуют в онкогенезе желудка. Поиск генов-мишеней для miRNA проводили с помощью программы MirTarget, написанной в нашей лаборатории. Программа определяет начало сайтов связывания miRNA с mRNA; расположение сайтов связывания в 5'UTR, CDS, 3'UTR; свободную энергию гибридизации (ΔG/ΔGm, где ΔGm – свободная энергия взаимодействия miRNA с комплементарной нуклеотидной последовательностью) и схемы взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA. Для анализа из Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) были отобраны 106 генов, наиболее часто участвующих в развитии рака желудка.

Сайты связывания miRNA рассматривали при отношении ΔG/ΔGm равном более 85%. Установлено, что 20% изученных генов не имеют сайтов связывания с 3701 miRNA [1]. С mRNA 106 генов связывались 255 miRNA в 431 сайте с отношением ΔG/ΔGm равным более 87%. Среди них, 103 сайта расположены в CDS, 157 сайтов – в 5'UTR и 171 сайтов – в 3'UTR. Выявлены mRNA генов *KDM1A, HDAC4* и *NFE2L2*, которые имеют полностью комплементарные сайты связывания с miRNA. mRNA гена *NFE2L2* имеет множественные сайты связывания в 5'UTR. miR-2-4453-3p, miR-19-21199-3p и miR-15-32047-5p, miR-1-155-3p, miR-2-3313-3p и miR-19-33623-3p имеют гомологичные сайты связывания в mRNA гена *NFE2L2*. mRNA гена *HDAC4* имеет в 5'UTR тридцать два сайта связывания с miRNA. В mRNA гена *HDAC4* сайты связывания miR-19-21199-3p, mir-1-2121-3p и miR-2-3313-3p располагались в 5'UTR; miR-16-40163-5p в 3'UTR; miR-6-17789-3p в CDS mRNA гена. Следовательно, все участки mRNA могут взаимодействовать с miRNA. mRNA гена *HDAC4* имеет гомологичные сайты связывания miR-19-44540-3p, miR-19-33623-3p и mir-1-2121-3p, расположенные в 5'UTR. Выявлено несколько miRNA которые имеют от одного до нескольких одинаковых сайтов связывания в mRNA одного гена. miR-15-36862-3p и miR-10-29282-3p имели по одиннадцать сайтов связывания в mRNA генов *ETS1* и *MGAT5*, со свободной энергией от -104 kJ/mole до -108 kJ/mole. Наличие таких множественных сайтов связывания свидетельствует о сильной зависимости экспрессии гена от каждой из этих miRNA. Начало сайтов связывания обеих miRNA совпадали, поэтому только одна из этих miRNA могла взаимодействать с одной mRNA. Однако, при наличии в близких концентрациях обеих miRNA, они могут связываться примерно с равной вероятностью, поскольку величины ΔG близкие.

Таблица. *Характеристики сайтов связывания miRNA и mRNA генов, участвующих в развитии рака желудка.*

Ген	miRNA	Начало сайта, нт.	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт.
ETS1*	miR-15-36862-3p	3875-3908	-108	89	23
ETS1	miR-10-29282-3p	3888-3908	-104	89	23
MGAT5*	miR-15-36862-3p	4308-4332	-108	89	23
MGAT5	miR-10-29282-3p	4308-4334	-104	89-91	23
NFE2L2**	mir-1-2121-3p	447-448	-140	89	25
NFE2L2	miR-15-32047-5p	444-445	-129÷-134	88-91	24
NFE2L2	miR-19-21199-3p	444-447	-138÷-144	88-92	25
NFE2L2	miR-19-33623-3p	447-448	-136	91	24
NFE2L2	miR-22-46979-5p	439-445	-123	89	23

BIOINFORMATICS AND IT

Ген	miRNA	Начало сайта, нт.	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Длина, нт.
NFE2L2	miR-2-3313-3p	442-448	-138÷-144	87-91	25
NFE2L2	miR-3-8100-5p	443-446	-129÷-132	88-90	24
NFE2L2	miR-9-28523-5p	441-453	-115	92	20
NFE2L2	miR-2-4453-3p	444-447	-121÷ -123	92-94	21

Примечание. ** - сайты в 3'UTR, ** - сайты в CDS*

Результаты этого исследования продемонстрировали, что miRNA могут осуществлять регуляцию экспрессии генов в 3'UTR, 5'UTR и CDS. Эти данные показали важность поиска сайтов в 5'UTR, так как там выявлена повышенная плотность сайтов.

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

INTERACTION OF miRNAS WITH mRNAS OF SOME GENES IN THE DEVELOPMENT OF STOMACH CANCER

Akimniyazova A.N., Niyazova R.E., Atambayeva Sh.A.

al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
050038, Almaty, al-Farabi avenue, 71
e-mail: atambayevashara@gmail.com

Identified miRNA binding sites with mRNA of genes that are key participants in stomach cancer. Established binding sites with high energy of hybridization which are arranged in the 5'UTR, CDS and 3'UTR in mRNA of these genes. Found four miRNA binding sites with full complementarity. The research results are useful for the development of methods for early diagnosis of cancer.

Key words: miRNA, mRNA, stomach cancer.

miRNA plays the important role in the regulation of oncogenes. Worldwide developed molecular non-invasive methods of early diagnosis of stomach cancer based on the analysis of blood changes in the concentration of metabolites, proteins, DNA, miRNA etc. Prediction of miRNA binding sites and searching them in mRNA oncogene essential for the development of methods for early diagnosis of cancer.

For this work it was created a database for the genes involved in the development of stomach cancer and a database of miRNAs. As the targets for miRNA was studied genes, which proteins are involved in carcinogenesis of the stomach. Search of target genes for miRNA was performed using MirTarget program, created in our laboratory. The program defines the beginning of the binding sites of miRNA with mRNA; the location of binding sites in 5'UTR, CDS, 3'UTR; the free energy of hybridization (ΔG/ΔGm, where ΔGm is the free energy of interaction of the miRNA with complementary nucleotide sequence), and interactions of nucleotides of miRNA with mRNA. For analysis it was selected 106 genes from Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), most frequently involved in the development of stomach cancer.

The binding sites of miRNA was considered in the ratio ΔG/ΔGm is equal to more than 85%. It is established that 20% of the studied genes do not have binding sites with 3701 miRNAs [1]. 106 mRNAs of genes associated with 255 miRNAs in 431 binding sites with ΔG/ΔGm ratio more than 87%. Among them, 103 binding sites located in CDS, 157 binding sites – in 5'UTR and 171 binding sites – in 3'UTR. Identified mRNA of *KDM1A, HDAC4* and *NFE2L2* genes, having fully complementary binding sites with miRNA. mRNA of *NFE2L2* gene has multiple binding sites in 5'UTR. miR-2-4453-3p, miR-19-21199-3p and miR-15-32047-5p, miR-1-155-3p, miR-2-3313-3p and miR-19-33623-3p have homological binding sited in mRNA of *NFE2L2* gene. mRNA of *HDAC4* gene has in 5'UTR thirty two binding sites with miRNA. In mRNA of *HDAC4* gene miR-19-21199-3p, mir-1-2121-3p, miR-2-3313-3p binding sites located in 5'UTR; miR-16-40163-5p in 3'UTR; miR-6-17789-3p in CDS of mRNA. Consequently, all regions of mRNA could interact with miRNA. In mRNA of *HDAC4*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

gene miR-19-44540-3p, miR-19-33623-3p, mir-1-2121-3p have homological binding sites, arranged in 5'UTR. It was identified miRNAs which has from one to several identical binding sites on the mRNA of a single gene. miR-15-36862-3p and miR-10-29282-3p has eleven binding sites by each in mRNA of *ETS1* and *MGAT5* genes, with free energy range from -104 kJ/mole to -108 kJ/mole. The presence of such multiple binding sites indicates strong dependence of gene expression from each of these miRNAs. The beginning of the binding sites, of both miRNA coincides, so only one of these miRNA could interact with a single mRNA. However, in the presence of similar concentrations of both miRNA they can be contacted with approximately equal probability, since the value of ΔG is close to each other.

Table. *The characteristics of binding sites of miRNAs and mRNAs of genes, responsible for the development of stomach cancer.*

Gene	miRNA	Start of sites, nt.	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt.
ETS1*	miR-15-36862-3p	3875-3908	-108	89	23
ETS1	miR-10-29282-3p	3888-3908	-104	89	23
MGAT5*	miR-15-36862-3p	4308-4332	-108	89	23
MGAT5	miR-10-29282-3p	4308-4334	-104	89-91	23
NFE2L2**	mir-1-2121-3p	447-448	-140	89	25
NFE2L2	miR-15-32047-5p	444-445	-129÷-134	88-91	24
NFE2L2	miR-19-21199-3p	444-447	-138÷-144	88-92	25
NFE2L2	miR-19-33623-3p	447-448	-136	91	24
NFE2L2	miR-22-46979-5p	439-445	-123	89	23
NFE2L2	miR-2-3313-3p	442-448	-138÷-144	87-91	25
NFE2L2	miR-3-8100-5p	443-446	-129÷-132	88-90	24
NFE2L2	miR-9-28523-5p	441-453	-115	92	20
NFE2L2	miR-2-4453-3p	444-447	-121÷ -123	92-94	21

Notes. ** - binding sites in 3'UTR, ** - binding sites in CDS*

The results of this study demonstrated that miRNA can regulate gene expression in a 5'UTR, 3'UTR and CDS. These data showed the importance of search sites in the 5'UTR, as there revealed increased density of sites.

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.

УДК 577.21

СВОЙСТВА САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miR-4763-3P С mRNA ОРТОЛОГОВ *NR2F6*

Юрикова О.Ю., Иващенко А.Т., Атамбаева Ш.А.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан
050038, Алматы, пр. аль-Фараби, 71,
e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

Установлены высоко гомологичные сайты связывания miR-4763-3p в mRNA гена *NR2F6* и его ортологах у животных. mRNA генов *NR2F1, NR2F2* и *NR2E3*, паралогичных *NR2F6*, не подвержены влиянию miR-4763-3p.

Ключевые слова: miR-4763-3p, mRNA, NR2F6, ортологичные гены, диагностика

BIOINFORMATICS AND IT

Применение miRNA в диагностике заболеваний, вызванных изменением экспрессии miRNA и их генов-мишеней, в значительной степени зависит от предсказания сайтов взаимодействия miRNA с mRNA. Нами показано, что в белок-кодирующей области (CDS) mRNA располагаются сайты связывания miRNA [1]. Ген NR2F6 участвует в развитии колоректального рака, рака простаты, молочной железы, шейки матки и лейкозов [2]. Из 2565 miRNA, имеющихся в GenBank, с использованием программы MirTarget [3] нами выявлена miR-4763-3p, которая имеет сайты связывания в CDS mRNA гена NR2F6. Взаимодействие miR-4763-3p с сайтом связывания mRNA гена NR2F6 характеризуется величиной ΔG равной -129.5 кДж/моль. Установленные участки связывания miR-4763-3p кодируют олигопептиды, включающие октапептид PALRAVPA, соответствующий нуклеотидной последовательности сайта связывания (таблица). Для большой группы видов животных олигопептид PALRAVPA фланкирован консервативными аминокислотами и в семи видах серин заменялся на аланин и в трех видах на аспарагин. В белках NR2F6 Erinaceus europaeus и Astyanax mexicanus имеется замена аланина на глицин и серин. Однако, эта замена незначительно снижает параметры взаимодействия miR-4763-3p с mRNA гена NR2F6. У A.forsteri и M.unicolor сайт полностью делетирован. У O.aries и N.nippon сайт связывания имеет вставку олигонуклеотида, которая препятствует взаимодействию с miR-4763-3p. Белки паралогичных генов NR2F1, NR2F2, NR2F3 содержат октапептиды с малой гомологией с октапептидом гена NR2F6 человека. Следовательно, экспрессия паралогов NR2F6 не зависит от miR-4763-3p и эта miRNA может быть предложена для диагностики заболеваний, ассоциированных с нарушением регуляции гена NR2F6.

Таблица *- Олигопептиды белка NR2F6 (выделены курсивом), кодируемые сайтами связывания miR-4763-3p в различных видах животных и человека.*

Олигопептиды	Виды животных
RFGRLLLRLPALRAVPASLISQLFFMR	Homo sapiens*
RFGRLLLRLPALRAVPAALISQLFFMR	Calypte anna**
RFGRLLLRLPALRAVPANLISQLFFMR	Danio rerio, Takifugu rubripes, Maylandia zebra
RFGRLLLRLPGLRAVPAALISQLFFMR RFGRLLLRLPSLRAVPANLISQLFFMR	Erinaceus europaeus Astyanax mexicanus
RFGRLLLRLPALGARRA-RAVPASLISQLFFMR RFGRLLSR-PALVRLPAPRAVPAALISQLFFMR	Ovis aries Nipponia nippon
DSAEYSCLKAIALFTPAPLISQLFFMR RFGRLLLRLPX--------SQLFFMR	Mesitornis unicolor Aptenodytes forsteri
QRFGRLLLRLPALRAVPASLISQLFFMR SRFGKLLLRLPSLRTVSSSVIEQLFFVR TRFGKLLLRLPSLRTVSSSVIEQLFFVR VRFGKLLLLLPSLRFITAERIELLFFRK	NR2F6 Homo sapiens NR2F1 Homo sapiens NR2F2 Homo sapiens NR2E3 Homo sapiens

** - Ailuropodamelanoleuca, Alligator sinensis, Alligator mississippiensis, Balaenoptera acutorostrata scammoni, Bos mutus, Bos taurus, Camelus dromedaries, Chelonia mydas, Clupea harengus, Condylura cristata, Mus musculus, Ornithorhynchus anatinus, Pan troglodytes, Physeter catodon, Propithecus coquereli, Pteropus alecto, Rattus norvegicus, … Ursus maritimus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis;*
*** - Aquila chrysaetoscanadensis, Calypte anna, Cuculus canorus, Falco cherrug, Falco peregrines, Monodelphis domestica, Taeniopygia guttata.*

Литература:

1. *Niyazova R. et al. miR-1322 Binding Sites in Paralogous and Orthologous Genes. BioMed. Res. Intern. 2014. P. 1-7. ID 962637.*
2. *Niu C. et al. NR2F6 expression correlates with pelvic lymph node metastasis and poor prognosis in early-stage cervical cancer// Int. J. Mol. Sci. 2016. Vol. 17. №10.*
3. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding Sites with mRNA of Human Genes// Bioinformation. 2014. Vol. 10. N.7. P. 423-427.*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

UDC 577.21

PROPERTIES OF THE BINDING SITES OF miR-4763-3P WITH mRNA OF *NR2F6* ORTHOLOGS

Yurikova O.Yu., Ivashchenko A.T., Atambayeva Sh.A.

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
050038, al-Farabi 71, Almaty, Kazakhstan.
e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

The highly homologous binding sites of miR-4763-3p were established in the mRNA of the NR2F6 gene and its orthologs in animals. mRNA of NR2F1, NR2F2 and NR2E3 genes, which are paralogs of NR2F6, are not affected by miR-4763-3p.

Key words: miR-4763-3p, mRNA, *NR2F6* gene, orthologous genes, diagnostics

Use of miRNA in the diagnosis of diseases caused by changes in expression of miRNA and their target genes largely depends on the prediction of miRNA interaction sites in mRNA. We have shown that miRNA binding sites are located in the protein coding region (CDS) of mRNA [1]. *NR2F6* gene involved in the development of colorectal cancer, prostate cancer, breast cancer, cervical cancer and leukemia [2]. Among 2565 miRNAs, available in GenBank, we identified miR-4763-3p which has binding sites in the CDS of mRNA of *NR2F6* gene with use the MirTarget program [3]. The interaction of miR-4763-3p with mRNA binding site of NR2F6 gene is characterized by the ΔG equal to -129,5 kJ/mole. Identified miR-4763-3p binding sites encode oligopeptides including octapeptide PALRAVPA that corresponds to nucleotide sequence of the binding site (table). PALRAVPA oligopeptide is flanked by conserved amino acids in a large group of animal species and in seven species serine is replaced by alanine and in three species serine is replaced by asparagine. However, this change slightly reduces parameters of miR-4763-3p interaction with mRNA of *NR2F6* gene. The binding site is deleted in *A.forsteri* and *M.unicolor.* In *O.aries* and *N.nippon* the binding site contains an insert of an oligonucleotide which prevents interaction with miR-4763-3p. Proteins of the paralogous *NR2F1, NR2F2, NR2F3* genes have low homology comparing with the octapeptide of *NR2F6* human gene. Therefore, the expression of paralogs of NR2F6 is not affected by miR-4763-3p and this miRNA can be offered for the diagnostics of diseases associated with dysregulation of *NR2F6* gene.

Table *- Oligopeptides of NR2F6 protein (italics) encoded by miRNA-4763-3p binding sites in various species of animals and in human.*

Oligopeptides	The species of animals
RFGRLLLRLPALRAVPASLISQLFFMR	Homo sapiens*
RFGRLLLRLPALRAVPAALISQLFFMR	Calypte anna**
RFGRLLLRLPALRAVPANLISQLFFMR	Danio rerio, Takifugu rubripes, Maylandia zebra
RFGRLLLRLPGLRAVPAALISQLFFMR RFGRLLLRLPSLRAVPANLISQLFFMR	Erinaceus europaeus Astyanax mexicanus
RFGRLLLRLPALGARRA-RAVPASLISQLFFMR RFGRLLSR-PALVRLPAPRAVPAALISQLFFMR	Ovis aries Nipponia nippon
DSAEYSCLKAIALFTPAPLISQLFFMR RFGRLLLRLPX--------SQLFFMR	Mesitornis unicolor Aptenodytes forsteri
QRFGRLLLRLPALRAVPASLISQLFFMR SRFGKLLLRLPSLRTVSSSVIEQLFFVR TRFGKLLLRLPSLRTVSSSVIEQLFFVR VRFGKLLLLLPSLRFITAERIELLFFRK	NR2F6 Homo sapiens NR2F1 Homo sapiens NR2F2 Homo sapiens NR2E3 Homo sapiens

** - Ailuropodamelanoleuca, Alligator sinensis, Alligator mississippiensis, Balaenoptera acutorostrata scammoni, Bos mutus, Bos taurus, Camelus dromedaries, Chelonia mydas, Clupea harengus, Condylura cristata, Mus musculus, Ornithorhynchus anatinus, Pan troglodytes, Physeter catodon, Propithecus coquereli, Pteropus alecto, Rattus norvegicus, … Ursus maritimus, Xenopus laevis, Xenopus tropicalis;*
*** - Aquila chrysaetoscanadensis, Calypte anna, Cuculus canorus, Falco cherrug, Falco peregrines, Monodelphis domestica, Taeniopygia guttata*

BIOINFORMATICS AND IT

References:
1. *Niyazova R. et al. miR-1322 Binding Sites in Paralogous and Orthologous Genes. BioMed. Res. Intern. 2014. P. 1-7. ID 962637.*
2. *Niu C. et al. NR2F6 expression correlates with pelvic lymph node metastasis and poor prognosis in early-stage cervical cancer// Int. J. Mol. Sci. 2016. Vol. 17. №10.*
3. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding Sites with mRNA of Human Genes// Bioinformation. 2014. Vol. 10. N.7. P. 423-427.*

УДК 577.21

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ miRNA С mRNA ГЕНОВ, ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ ИЗМЕНЯЕТСЯ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Байжигитова Д.Т., Атамбаева Ш.А., Ниязова Р.Е.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан
050038, Алматы, пр.аль-Фараби, 71
e-mail: Raygul.Nyiyazova@kaznu.kz

Установлены характеристики сайтов связывания miR-11-27078-5p, miR-3-5147-5p, miR-10-29282-3p, miR-15-36862-3p, miR-1-2121-3p, miR-19-21199-3p, miR-1-155-3p, miR-19-33623-3p, имеющих два и более сайтов связывания в mRNA генов *CD40LG, CDKN2B, IGF1, OLR1, SP1, SCAP, ADRB1, PDE4D,* экспрессия которых изменяется при инфаркте миокарда.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, ген, инфаркт миокарда, диагностика

Одним из возможных факторов развития инфаркта миокарда, являются miRNA, которые действуют как регуляторы экспрессии генов. Основной проблемой предсказания сайтов связывания miRNA в mRNA генов-мишеней является несовершенство соответствующих программ. Нами разработана программа MirTarget [1], позволяющая определять следующие характеристики связывания miRNA: начало сайта, связывающего miRNA с mRNA; положение сайтов в 5'UTR, CDSs или 3'UTR mRNA; свободная энергия гибридизации ΔG (кДж/моль); отношение ΔG/ΔGm (%) для каждого сайта (где ΔGm - свободная энергия связывания miRNA с полностью комплементарной последовательностью); схема взаимодействия нуклеотидов между miRNA и mRNA. Из 3701 miRNA [2] нами выявлены те, которые имеют в mRNA генов-мишеней два и более сайтов связывания. miR-11-27078-5p и miR-3-5147-5p имеют по 16 последовательно расположенных и совпадающих сайтов в mRNA гена *CD40LG* (таблица). Эти же miRNA имеют по четыре сайта связывания в mRNA гена *CDKN2B*. По девять сайтов связывания для этих miRNA содержит mRNA гена *IGF1* и по два сайта содержит mRNA гена *OLR1*. Причина совпадения сайтов заключается в высокой гомологии нуклеотидных последовательностей miR-11-27078-5p и miR-3-5147-5p. Другая пара гомологичных miR-10-29282-3p и miR-15-36862-3p имели совпадающие сайты связывания в mRNA гена *SP1*. Были выявлены miR-1-2121-3p, miR-19-21199-3p и miR-1-155-3p, имеющие совпадающие сайты связывания в mRNA генов *SCAP, ADRB1* и *PDE4D.* В mRNA генов-мишеней каждый из сайтов связывания обладает высоким сродством к miRNA. Поскольку число этих сайтов для miRNA достигает 16, то это означает многократное увеличение вероятности связывания miRNA и более длительное существование комплекса miRNA с mRNA.

Таблица *– Характеристики связывания miRNA с mRNA генов, экспрессия которых изменяется при инфаркте миокарда*

Ген	miRNA	Начало сайтов, н.	ΔG, кДж/моль	ΔG/ ΔGm, %	Длина, н.
CD40LG	miR-11-27078-5p (16)	1549 ÷ 1579	-108	89	23
CD40LG	miR-3-5147-5p (16)	1549 ÷ 1579	-100	90	22
CDKN2B	miR-11-27078-5p (4)	1746 ÷ 1752	-108	89	23
CDKN2B	miR-3-5147-5p (4)	1746 ÷ 1752	-100	90	22

БИОИНФОРМАТИКА И IT

IGF1	miR-11-27078-5p (9)	4042 ÷ 4058	-108	89	23
IGF1	miR-3-5147-5p (9)	4042 ÷ 4058	-100	90	22
OLR1	miR-11-27078-5p (2)	1054 ÷ 1056	-108	89	23
OLR1	miR-3-5147-5p (2)	1054 ÷ 1056	-100	90	22
SP1	miR-10-29282-3p (8	4147 ÷ 4161	-104	89	23
SP1	miR-15-36862-3p (7)	4147 ÷ 4159	-108	89	23
SCAP	miR-19-33623-3p (2)	102 ÷ 105	-132÷ -134	89 ÷ 90	24
SCAP	mir-1-2121-3p (5)	99 ÷ 106	-140 ÷-142	89 ÷ 92	25
SCAP	miR-19-21199-3p (6)	102 ÷ 111	-138 ÷-151	88 ÷ 96	25
SCAP	miR-1-155-3p (5)	102 ÷ 114	-125÷-132	91 ÷ 95	22
ADRB1	mir-1-2121-3p (5)	946 ÷ 959	-138÷-155	88 ÷ 99	25
ADRB1	miR-19-21199-3p (5)	951 ÷ 961	-138÷-151	88 ÷ 96	25
ADRB1	miR-1-155-3p (2)	961 ÷ 967	-127÷-136	92 ÷ 98	22
PDE4D	mir-1-2121-3p (4)	404 ÷ 411	-138÷-142	88 ÷ 91	25
PDE4D	miR-19-21199-3p (6)	337 ÷ 412	-138÷-144	88 ÷ 92	25
PDE4D	miR-1-155-3p (4)	344 ÷ 413	-125÷-129	91 ÷ 94	22

Примечание. *В скобках указано число сайтов связывания.*

Литература:
1. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes// Bioinformation. 2014. Vol. 10. N.7. P. 423-427.*
2. *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

miRNA INTERACTION WITH mRNA OF GENES WHICH EXPRESSION IS CHANGED AT MYOCARDIAL INFARCTION

Baizhigitova D.T., Atambayeva Sh. A., Niyazova R. Ye.

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
050038, Almaty, al-Farabi av. 71.
e-mail: Raygul.Nyiyazova@kaznu.kz

It was determined binding sites characteristics of miR-11-27078-5p, miR-3-5147-5p, miR-10-29282-3p, miR-15-36862-3p, miR-1-2121-3p, miR-19-21199-3p, miR-1-155-3p, miR-19-33623-3p that have binding sites in mRNA of *CDKN2B, IGF1, OLR1, SP1, SCAP, ADRB1, PDE4D* genes which expression is changed at myocardial infarction.

Key words: miRNA, mRNA, gene, myocardial infarction, diagnostics

miRNAs are one of the possible factors of myocardial infarction development act as genes expression regulators. The main problem of miRNA binding sites prediction is imperfection of appropriate programs. We've developed MirTarget program [1] that is able to determine the following features of binding miRNAs: the start of the initiation of miRNAs binding to mRNAs; the localization of miRNAs binding sites in the 5'UTRs, CDSs and 3'UTRs of the mRNAs; the free energy of hybridization ΔG (kJ/mole); the ratio ΔG/ΔGm (%), which was determined for each site (ΔGm equals the free energy of miRNA binding with its perfect complementary nucleotide sequence); the schemes of nucleotide interactions between miRNAs and mRNAs.

We defined miRNAs from 3701 ones [2] that have two and more binding sites in mRNAs of target-genes.

BIOINFORMATICS AND IT

miR-11-27078-5p and miR-3-5147-5p both have 16 successively located concurred sites in CD40LG gene's mRNA (table). miRNAs also have four binding sites in CDKN2B gene's mRNA. mRNAs of IGF1 and of OLR1 genes have nine and two binding sited respectively. Reason of the sited concurrence is due to high homology of miR-11-27078-5p and miR-3-5147-5p nucleotide sequences. Another pair of homological miR-10-29282-3p and miR-15-36862-3p have binding sites in mRNA of SP1 gene. miR-1-2121-3p, miR-19-21199-3p and miR-1-155-3p were defined to have concurred sites in SCAP, ADRB1 и PDE4D genes mRNAs.

Table *– Characteristics of miRNAs binding with mRNAs of genes which expression is changed at myocardial infarction*

Gene	miRNA	Starts of sites, nt	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt
CD40LG	miR-11-27078-5p (16)	1549 ÷ 1579	-108	89	23
CD40LG	miR-3-5147-5p (16)	1549 ÷ 1579	-100	90	22
CDKN2B	miR-11-27078-5p (4)	1746 ÷ 1752	-108	89	23
CDKN2B	miR-3-5147-5p (4)	1746 ÷ 1752	-100	90	22
IGF1	miR-11-27078-5p (9)	4042 ÷ 4058	-108	89	23
IGF1	miR-3-5147-5p (9)	4042 ÷ 4058	-100	90	22
OLR1	miR-11-27078-5p (2)	1054 ÷ 1056	-108	89	23
OLR1	miR-3-5147-5p (2)	1054 ÷ 1056	-100	90	22
SP1	miR-10-29282-3p (8	4147 ÷ 4161	-104	89	23
SP1	miR-15-36862-3p (7)	4147 ÷ 4159	-108	89	23
SCAP	miR-19-33623-3p (2)	102 ÷ 105	-132÷ -134	89 ÷ 90	24
SCAP	mir-1-2121-3p (5)	99 ÷ 106	-140 ÷-142	89 ÷ 92	25
SCAP	miR-19-21199-3p (6)	102 ÷ 111	-138 ÷-151	88 ÷ 96	25
SCAP	miR-1-155-3p (5)	102 ÷ 114	-125÷-132	91 ÷ 95	22
ADRB1	mir-1-2121-3p (5)	946 ÷ 959	-138÷-155	88 ÷ 99	25
ADRB1	miR-19-21199-3p (5)	951 ÷ 961	-138÷-151	88 ÷ 96	25
ADRB1	miR-1-155-3p (2)	961 ÷ 967	-127÷-136	92 ÷ 98	22
PDE4D	mir-1-2121-3p (4)	404 ÷ 411	-138÷-142	88 ÷ 91	25
PDE4D	miR-19-21199-3p (6)	337 ÷ 412	-138÷-144	88 ÷ 92	25
PDE4D	miR-1-155-3p (4)	344 ÷ 413	-125÷-129	91 ÷ 94	22

Note. In bracket is number of binding sites.

Each binding site in target-genes' mRNAs has high affinity to miRNAs. Because sites amount is 16 it means multiple increasing of probability miRNAs binding and more prolonged existence of miRNA-mRNA complex.

References:

1. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes// Bioinformation. 2014. Vol. 10. N.7. P. 423-427.*
2. *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.*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

УДК 577.21

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ MIRNA С MRNA НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ РАКА ЛЕГКОГО

Мамирова А.А., Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е.

Казахский национальный университет им.аль_Фараби, Алматы, Казахстан
050038, Алматы, пр.аль-Фараби, 71,
e-mail: Raygul.Nyiyazova@kaznu.kz

Установлены характеристики сайтов связывания пар miRNA (miR-10-29282-3p и miR-15-36862-3p, miR-11-27078-5p и miR-3-5147-5p, miR-1-2121-3p и miR-19-33623-3p), имеющих идентичные сайты связывания в mRNA генов *CDK6*, *ITGA11*, *SSX2, CEBPA, CHKA, HMGA2, LATS2* и *USP7,* участвующих в развитии рака легкого.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, ген, рак легкого, диагностика

Рак легкого является ведущей причиной смертности во всем мире. Для диагностики заболевания используются miRNA, специфически связывающиеся с mRNA генов-мишеней и ингибирующие трансляцию белков. Проведен поиск ассоциаций miRNA и mRNA генов-мишеней, участвующих в развитии рака легкого, с целью использования их в ранней неинвазивной диагностике этого заболевания. Нами разработана программа MirTarget [1], позволяющая определять следующие характеристики связывания miRNA: начало сайта, связывающего miRNA с mRNA; положение сайтов в 5'UTR, CDSs или 3'UTR mRNA; свободная энергия гибридизации ΔG (кДж/моль); отношение ΔG/ΔGm (%) для каждого сайта (где ΔGm - свободная энергия связывания miRNA с полностью комплементарной последовательностью); схема взаимодействия нуклеотидов между miRNA и mRNA. Из 3701 miRNA [2] нами выявлено несколько пар miRNA, которые имеют от одного до нескольких одинаковых сайтов связывания в mRNA одного гена (таблица). miR-10-29282-3p и miR-15-36862-3p имели по шесть сайтов связывания в mRNA гена, что свидетельствует о сильной зависимости экспрессии гена от каждой miRNA. Начало сайтов связывания обеих miRNA совпадали, поэтому только одна из этих miRNA могла взаимодействовать с одной mRNA. Однако, при наличии в близких концентрациях обеих miRNA они могут связываться примерно с равной вероятностью, поскольку величины ΔG близкие. Более удивительными оказались miR-11-27078-5p и miR-3-5147-5p, которые связывались с mRNA генов *ITGA11* и *SSX2* (таблица). Обе miRNA имели по 19 идентичных сайтов связывания в mRNA *ITGA11* и близкие характеристики взаимодействия. Эти же miRNA имели по десять идентичных сайтов связывания в mRNA гена *SSX2*. Пара miR-1-2121-3p и miR-19-33623-3p имела по два одинаковых сайта связывания в mRNA гена *CEBPA*. Эта пара miRNA имела по два сайта связывания, разделенных на несколько десятков нуклеотидов, в mRNA гена *CHKA* и гена *USP7*. mRNA генов *HMGA2* и *LATS2* содержали по одному сайту связывания обеих miRNA. Выявленные ассоциации miRNA и mRNA генов можно использовать в диагностике рака легкого.

Таблица *– Характеристики сайтов связывания ассоциаций miRNA и mRNA генов, участвующих в развитии рака легкого.*

Gene	miRNA	Start of sites, nt	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt
CDK6	miR-10-29282-3p (6)	1900 ÷ 1918	-104	89	23
CDK6	miR-15-36862-3p (6)	1900 ÷ 1918	-108 ÷ -115	89 ÷ 95	23
ITGA11	miR-11-27078-5p (19)	4598 ÷ 4634	-108	89	23
ITGA11	miR-3-5147-5p (19)	4598 ÷ 4634	-100	90	22
SSX2	miR-11-27078-5p (10)	1109 ÷ 1127	-108	89	23
SSX2	miR-3-5147-5p (10)	1109 ÷ 1127	-100	90	22
CEBPA	mir-1-2121-3p (2)	648 ÷ 651	-140 ÷ -142	89 ÷ 91	24
CEBPA	miR-19-33623-3p (2)	648 ÷ 651	-132	89	25
CHKA	mir-1-2121-3p (1)	386	-140	89	24
CHKA	miR-19-33623-3p (1)	386			25

BIOINFORMATICS AND IT

CHKA	mir-1-2121-3p (1)	422	-151	96	24
CHKA	miR-19-33623-3p (1)	422	-140	94	25
HMGA2	mir-1-2121-3p (1)	544	-146	93	24
HMGA2	miR-19-33623-3p (1)	544	-142	96	25
LATS2	mir-1-2121-3p (1)	1851	-142	91	24
LATS2	miR-19-33623-3p (1)	1851	-132	89	25
USP7	mir-1-2121-3p (1)	15	-138	88	24
USP7	miR-19-33623-3p (1)	15	-134	90	25
USP7	mir-1-2121-3p (1)	92 ÷ 99	-140 ÷ -149	89 ÷ 95	24
USP7	miR-19-33623-3p (1)	92 ÷ 99	-132 ÷ -138	89 ÷ 93	25

Примечание. *В скобках указано число сайтов связывания.*

Литература:
1. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes// Bioinformation. 2014. Vol. 10. N.7. P. 423-427.*
2. *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

INTERACTION MIRNAS WITH MRNAS OF SOME GENES INVOLVED IN LUNG CANCER DEVELOPMENT

Mamirova A.A., Ivashchenko A.T., Niyazova R.E.

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
050038, Almaty, al-Farabi avenue 71,
e-mail: Raygul.Nyiyazova@kaznu.kz

Characteristics of binding sites of miRNA pairs (miR-10-29282-3p and miR-15-36862-3p, miR-11-27078-5p and miR-3-5147-5p, miR-1-2121-3p and miR-19-33623-3p) that have identical binding sites with mRNAs of *CDK6*, *ITGA11*, *SSX2, CEBPA, CHKA, HMGA2, LATS2* and *USP7* genes involved in lung cancer development were established.

Key words: miRNA, mRNA, gene, lung cancer, diagnostics.

Lung cancer is the leading cause of death in worldwide. MiRNAs, that specifically bind with mRNA of target-genes and inhibit protein translation, are used for the diagnostics of the disease. Search of miRNA and target-genes' mRNA associations aiming for use them in early non-invasive diagnostics of this disease. The MirTarget program defines the following features of binding: the start of the initiation of miRNAs binding to mRNAs; the localization of miRNAs binding sites in the 5'UTRs, CDSs and 3'UTRs of the mRNAs; the free energy of hybridization ΔG (kJ/mole); the ratio ΔG/ΔGm (%) which was determined for each site (ΔGm equals the free energy of miRNAs binding with its perfect complementary nucleotide sequence); the schemes of nucleotide interactions between the miRNAs and the mRNAs [1]. We identified several pairs of miRNAs from 3701 miRNA [2], which have from one to several identical binding sites with mRNAs of one (single) gene (Table). miR-10-29282-3p and miR-15-36862-3p have six binding sites with mRNAs of genes that indicate strong dependence of gene expression from each miRNA. Starts of binding sites are common for both miRNAs, so only one of them can interact with one mRNA. However, if two miRNAs have similar concentrations, they can bind with equal probability because the values of ΔG are similar.

miR-11-27078-5p and miR-3-5147-5p are more surprising, they bind with mRNA of ITGA11 and SSX2 genes (Table). Both of miRNAs have close characteristics of interaction and 19 identical binding sites with mRNA of ITGA11 gene. These miRNAs have 10 identical binding sites with mRNA of SSX2gene. miR-1-2121-3p and miR-19-33623-3p have two identical binding sites with mRNA of CEBPA gene. This pair of miRNAs have two binding sites, divided on a few tens of nucleotides in the mRNAs of CHKA and USP7 genes. mRNAs of HMGA2 and LATS2 genes contain one binding site of both miRNAs. Identified association of miRNAs and genes mRNAs can be used in the diagnosis of lung cancer.

БИОИНФОРМАТИКА И IT

Table *– Characteristics of binding sites of miRNAs and mRNAs of genes involved in lung cancer development*

Gene	miRNA	Start of sites, nt	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt
CDK6	miR-10-29282-3p (6)	1900 ÷ 1918	-104	89	23
CDK6	miR-15-36862-3p (6)	1900 ÷ 1918	-108 ÷ -115	89 ÷ 95	23
ITGA11	miR-11-27078-5p (19)	4598 ÷ 4634	-108	89	23
ITGA11	miR-3-5147-5p (19)	4598 ÷ 4634	-100	90	22
SSX2	miR-11-27078-5p (10)	1109 ÷ 1127	-108	89	23
SSX2	miR-3-5147-5p (10)	1109 ÷ 1127	-100	90	22
CEBPA	mir-1-2121-3p (2)	648 ÷ 651	-140 ÷ -142	89 ÷ 91	24
CEBPA	miR-19-33623-3p (2)	648 ÷ 651	-132	89	25
CHKA	mir-1-2121-3p (1)	386	-140	89	24
CHKA	miR-19-33623-3p (1)	386	-129	87	25
CHKA	mir-1-2121-3p (1)	422	-151	96	24
CHKA	miR-19-33623-3p (1)	422	-140	94	25
HMGA2	mir-1-2121-3p (1)	544	-146	93	24
HMGA2	miR-19-33623-3p (1)	544	-142	96	25
LATS2	mir-1-2121-3p (1)	1851	-142	91	24
LATS2	miR-19-33623-3p (1)	1851	-132	89	25
USP7	mir-1-2121-3p (1)	15	-138	88	24
USP7	miR-19-33623-3p (1)	15	-134	90	25
USP7	mir-1-2121-3p (1)	92 ÷ 99	-140 ÷ -149	89 ÷ 95	24
USP7	miR-19-33623-3p (1)	92 ÷ 99	-132 ÷ -138	89 ÷ 93	25

Note. *In bracket is number of binding sites.*

References:
1. *Ivashchenko A. et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformation. 2014. V. 10. N.7. P. 423-427.*
2. *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.*

УДК 621.039.75

ПРИМЕНЕНИЕ CALS-ТЕХНОЛОГИЙ И КОМПЬЮТЕРНОЙ СТЕГАНОГРАФИИ ДЛЯ ОБРАБОТКИ БОЛЬШИХ МАССИВОВ ДАННЫХ BIG DATA И СУПЕРКОМПЬЮТЕРНЫХ ВЫЧИСЛЕНИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Раткин Л. С.

ООО «АРГМ», Москва, Россия
119049, Москва, Ленинский проспект, д. 4, стр. 1А
e-mail: rathkeen@bk.ru

Рассмотрено использование технологий поддержки жизненного цикла продукции и компьютерной стеганографии для изучения молекулярных механизмов действия ферментов. Особое внимание уделяется применению суперкомпьютерных вычислений и механизмам обработки больших массивов данных Big Data.

Ключевые слова: CALS-технологии; компьютерная стеганография; большие массивы данных; суперкомпьютерные вычисления; молекулярные механизмы; действия ферментов.

BIOINFORMATICS AND IT

Для изучения молекулярных механизмов действия ферментов предлагается использование суперкомпьютерных технологий и систем обработки больших массивов данных Big Data терабайтного, петабайтного и экзабайтного классов, что предполагает, в частности, применение CALS-технологии непрерывной информационной поддержки жизненного цикла продукции (Continuous Acquisition and Life-cycle Support – CALS). Их внедрение в промышленное биотехнологическое производство повышает эффективность, производительность и рентабельность процессов хозяйственной деятельности предприятий различных отраслей (в т.ч., медицинского и сельскохозяйственного профиля). Предлагаемые методы информационного взаимодействия участников жизненного цикла биотехнологической продукции позволяют оптимизировать работу в едином информационном пространстве для взаимодействия биотехнологических предприятий – субъектов жизненного цикла – с применением открытых архитектур, апробированных российских и зарубежных коммерческих продуктов обмена данными терабайтного, петабайтного и экзабайтного класса и международных стандартов форматов представления данных и методов доступа к ним.

Технология поддержки жизненного цикла продукции для изучения молекулярных механизмов действий ферментов, в частности, включает этапы маркетинга и изучения рынка, инжиниринга и разработки продукции, планирования и разработки процессов для производства продукции, упаковки и хранения биотехнологических изделий, производства биотехнологической продукции и закупки необходимых комплектующих и сырья, ее реализации, ввода в эксплуатацию биотехнологических изделий, технической помощи и обслуживания, гарантийной и постгарантийной эксплуатации и утилизации. Важной особенностью предлагаемых технологий является применение авторской разработки в сфере компьютерной стеганографии, позволяющей скрытно хранить и передавать из одного этапа в другой необходимый набор финансово-экономических параметров проекта по разработке биотехнологической продукции и значения ее характеристик. Разработаны информационные системы по инвестиционным биотехнологическим проектам, НИОКР и выпускаемой серийно биотехнологической продукции и маркетинговым исследованиям и сфере биотехнологий.

Важным практическим межотраслевым результатом, полученным в ходе исследования информационных систем для изучения молекулярных механизмов действий ферментов с применением CALS-технологий, является тот факт, что чем выше класс обрабатываемых с помощью суперкомпьютерных вычислений больших массивов данных Big Data (терабайтный, петабайтный или экзабайтный), тем лучше и надежнее осуществляется скрытая передача финансово-экономических параметров биотехнологических проектов и физико-химических и других характеристик биопродукции с помощью компьютерной стеганографии. Разработка защищена патентом на изобретение в РФ и за рубежом.

UDC 621.039.75

APPLIED CALS-TECHNOLOGIES AND COMPUTER STEGANOGRAPHY FOR BIG DATA TREATMENT AND SUPERCOMPURING CALCULATIONS FOR RESEARCHING OF MOLECULAR MECHANISMS OF FERMENT ACTIONS

Rathkeen Leonid. S.

«ARGM» LLC, Moscow, Russia
119049, Moscow, Leninsky prospect, bldg. 4, 1A
e-mail: rathkeen@bk.ru

The technologies for Continuous Acquisition and Lifecycle Support and computer steganography for researching of molecular mechanisms of ferment actions are discussed. Most attention is paid for supercomputing calculations and mechanisms of treatment of Big Data.

Key words: CALS-technologies; computer steganography; Big Data; supercomputing calculations; molecular mechanisms; ferment actions.

For researching of molecular mechanisms of ferment actions are presented the supercomputing technologies and systems for treatment of Big Data of terabyte, petabyte and exzabyte classes, what also needs the applied CALS-technologies (Continuous Acquisition and Life-cycle Support – CALS). Its application in the field of industrial biotechnological producing increase the efficiency and productivity of processes of enterprises of different fields (including medical and agricultural). This methods of information cooperation of the participants of

БИОИНФОРМАТИКА И IT

lifecycle of biotechnological products helps to optimize the work in common information space for cooperation of biotechnological enterprises – the subjects of lifecycle – with the applied opened architectures, Russian and foreign products for changing of terabyte, petabyte and exzabyte Big Data and international standards of data formats and access methods.

Technology for product lifecycle for researching of molecular mechanisms of ferment action also includes the steps of marketing, engineering and production design, planning and developing of processes for industrial production, packing and storing of biotechnological products, biotechnological producing and buying the necessary components and raw materials, its realization, exploitation of biotechnological products, technical assistance and servicing, guarantee and post-guarantee work and utilization. The important features of suggested technologies are the applications of author design on the field of computer steganography, which helps to steganographic store and translate from one step to another the set of financial and economical parameters of projects for developing of biotechnological products and its characteristics. In the frame of scientific work are developed the information system for investment biotechnological projects, research and design works and serially produced biotechnological products and marketing researching in the field of biotechnology.

The important practical multi-branch result is, which was achieved during the processes of scientific researching of information systems for study of molecular mechanisms of ferment action with the CALS-technologies, is the fact, that if the class of treated by supercomputing calculations Big Data (terabyte, petabyte or exzabyte) becomes higher, than the computer steganographic transmission of financial and economical parameters of biotechnological projects and physical-chemical and other characteristics of biological products becomes better and more reliability. The invention is protected by Russian and foreign patents.

УДК 575.112:004

ПОЛИПЛОИДИЯ АКТИВИРУЕТ ПУТИ ЭМБРИОГЕНЕЗА В ТКАНЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПОПАРНО-ПЕРЕКРЕСТНОГО СРАВНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМОВ

Анацкая О.В., Еренпрейса Е. А., Никольский Н.Н., Сидоренко Н.В., Виноградов А.Е.

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

Полиплоидия связана с канцерогенезом и дегенеративными расстройствами. В то же время, физиологическая роль этого явления не ясна. Сравнение транскриптомов тканей млекопитающих показало, что полиплоидия ассоциирована с активацией генных модулей эмбриогенеза и подавлением генных модулей дифференцировки. Полученные данные улучшат понимание роли полиплоидии в нормальной физиологии и трансформации.

Ключевые слова: сравнение транскриптомов, полиплоидия, ткани млекопитающих, пути эмбриогенеза и дифференцировки.

Полиплоидизация соматических клеток является одной из частых и наименее изученных причин эпигенетических изменений транскриптома. Сохраняя баланс дозы генов, это явление может оказывать лишь слабое воздействие на работу отдельных генов. В то же время, модифицируя активность тысяч генов одновременно, полиплоидия участвует в координации процессов постнатального развития, онтогенетического программирования, дифференцировки и патогенеза многих заболеваний, включая сердечно-сосудистые и онкологические (Anatskaya, et al., 2010; Erenpreisa, Cragg, 2013; Vazquez-Martin, et al., 2016). В настоящее время, влияние полиплоидии на процессы морфогенеза практически не изучено. Для того чтобы прояснить этот вопрос, мы исследовали эффекты полиплоидии на активность генных модулей развития, эмбриогенеза, стволовости, морфогенеза и дифференцировки методом межвидового сравнения транскриптомов. Основой метода является попарно-перекрестное сравнение транскриптомов в тканях с разной полиплоидизацией. В нашем случае это сердце человека/сердце мыши и печень мыши/печень человека. Источником данных служила база BioGPS (Wu, et al., 2016). Сравнение выявило 672 гена с повышенным и 831 гена с пониженным уровнем мРНК в полиплоидных тканях по сравнению с диплоидными тканями при 1,5 кратном пороге различий. Из общего списка GO биологических процессов, достоверно обогащенных регулируемыми плоидностью генами,

BIOINFORMATICS AND IT

92 процесса содержали в названии термины “development”, “embryo”, “morphogenesis”, “differentiation” и “stem cell” и поэтому представляли особый интерес. Из 92 процессов, 82 относились к развитию и дифференцировке (Рис. 1а), а 10 процессов - к пролиферации и поддержанию стволовой клетки (“stem cell proliferation”, “stem cell maintenance”, “stem cell division”, “stem cell proliferation”) (Рис. 1б). Показано, что активированные плоидностью гены преимущественно обогащают GO процессы, координирующие развитие и морфогенез, а также пролиферацию и поддержание стволовых клеток. Подавленные плоидностью гены обогащают, преимущественно, GO процессы, координирующие дифференцировку (Рис. 1а и б), подтверждая каузальность связи между полиплоидией и индукцией фетальных и морфогенетических программ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что полиплоидия не является следствием терминальной дифференцировки и старения. Более того, они хорошо согласуются с данными об активации полиплоидией программ стволовости, полученными ранее на гигантских трансформированных клетках (Erenpreisa, Cragg, 2013). В связи с этим представленные сведения помогут улучшить понимание роли полиплоидии в нормальной физиологии, трансформации и других патологических состояниях.

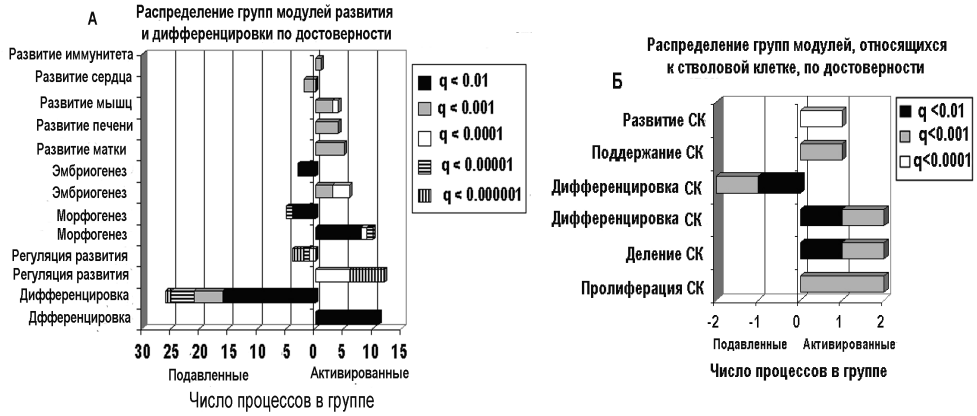


Рис.1. *GO биологические процессы, относящихся к развитию, дифференцировке (А) и стволовой клетке (Б), которые обогащены регулируемыми плоидностью генами в сравнениях сердце человека/сердце мыши и печени мыши/печени человека. q - означает значение p, в которое внесена поправка на множественность тестов, СК – стволовая клетка.*

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 14-50-00068) и РФФИ.

Литература:

1. *Anatskaya O.V., Sidorenko N.V., Beyer T.V., Vinogradov A. E. Neonatal cardiomyocyte ploidy reveals critical windows of heart development //Int. J .Cardiol. 2010. Vol. 141. № 1. P. 81-91.*
2. *Erenpreisa J., Cragg M.S. Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal// Cancer Cell Int. 2013. Vol. 13. P. 92-80.*
3. *Pandit S. K, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells// Trends Cell Biol. 2013. Vol. 23. P. 556-566.*
4. *Vazquez-Martin A., Anatskaya O. V., Giuliani A., Erenpreisa J., Huang S., Salmina K., Inashkina I., Huna A., Nikolsky N. N, Vinogradov A. E. Somatic polyploidy is associated with the upregulation of c-MYC interacting genes and EMT-like signature //Oncotarget. 2016. Vol. 7. № 58. P. 75235-75260.*
5. *Wu C., Jin X., Tsueng G., Afrasiabi C., Su A. I. BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles//Nucleic Acids Res. 2016. Vol. 44. P. D313-316.*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

UDC 575.112:004

POLYPLOIDY BOOSTS EMBRYOGENIC PATHWAYS IN MAMMALIAN TISSUES: THE RESULTS OF PAIR-WISE CRISS-CROSS TRANSCRIPTOME ANALYSIS

Anatskaya O. V., Erenpreisa J., Nikolsky N. N., Sidorenko N. V., Vinogradov A. E.

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

Polypoidy is associated with carcinogenesis and degenerative disorders. At the same time, physiological significance of this phenomenon is not clear. Cross-species transcriptome comparison of various mammalian tissues indicated that polyploidy activates gene modules of embryogenesis and impairs gene modules of differentiation. The obtained results promote our understanding of polyploidy in normal physiology and transformation.

Key words: transcriptome comparison, polyploidy, mammalian tissues, embryogenesis and differentiation pathways.

Somatic cell polyploidy is a common and almost uninvestigated trigger of epigenetic changes. Maintaining gene dosage balance, it has little impact on activity of separate genes. At the same time, modifying activity of thousands of genes at a time, polyploidy participates in coordination of postnatal development, developmental programming, differentiation and pathogenesis of many diseases, including cardiovascular diseases and cancer (Anatskaya, et al., 2010; Erenpreisa, Cragg, 2013; Vazquez-Martin, et al., 2016). Currently, the impact of polyploidy on morphogenetic processes remains poorly understood. To address this question, we investigated effects of polyploidy on activity of gene modules related to development, embryogenesis, stemness, morphogenesis and differentiation by the method of extensive criss-cross species transcriptome comparison. The method is based on pair-wise transcriptome comparison of tissues with different degree of polyploidization. In the present study, we compared human heart vs mouse heart and mouse liver vs human liver. The data on transcriptome activity were taken from BioGPS data base (Wu, et al., 2016). The comparison revealed 672 genes with the increased and 831 genes with the decreased levels of mRNA in polyploid vs diploid tissues at 1.5 fold threshold for expression difference. Of a total list of GO categories that were significantly enriched for ploidy regulated genes, 92 contained in their titles terms “development”, “embryo”, “morphogenesis”, “differentiation” and “stem cell” and thus were of particular interest. Of 92 processes, 82 related to development and differentiation (Fig.1a) and 10 – to stem cell proliferation and maintenance and contained terms “stem cell proliferation”, “stem cell maintenance”, “stem cell division”, “stem cell proliferation” (Fig. 1b). Our data indicate that ploidy induced genes predominantly enrich GO processes coordinating development, morphogenesis, proliferation and stem cell maintenance. Ploidy inhibited genes enrich GO processes implicated in differentiation (Fig. 1 a,b), confirming causal link between polyploidy and the induction of fetal and morphogenetic programs.

In conclusion, our results suggest that somatic polyploidy is not a consequence of terminal differentiation and ageing. Moreover, they are in good agreement with the previous data obtained with giant cancer cells that confirm the link between polyploidy and stemness activation (Erenpreisa, Cragg, 2013). Thus, the data presented here may promote understanding role of polyploidy in normal physiology, carcinogenesis and other pathologic conditions.

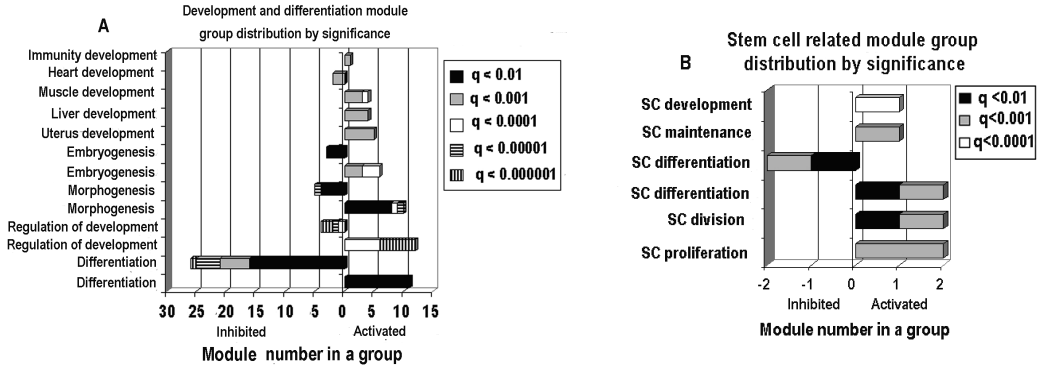


Fig.1. *GO biological processes related to development, differentiation (A) and stem cell (B) that are enriched by ploidy regulated genes in human heart/mouse heart and mouse liver/human liver comparisons. q – means p value with multiple comparison tests. SC –stem cell.*

BIOINFORMATICS AND IT

References:

1. *Anatskaya O.V., Sidorenko N.V., Beyer T.V., Vinogradov A. E. Neonatal cardiomyocyte ploidy reveals critical windows of heart development //Int. J .Cardiol. 2010. Vol. 141. № 1. P. 81-91.*
2. *Erenpreisa J., Cragg M.S. Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal// Cancer Cell Int. 2013. Vol. 13. P. 92-80.*
3. *Pandit S. K, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells// Trends Cell Biol. 2013. Vol. 23. P. 556-566.*
4. *Vazquez-Martin A., Anatskaya O. V., Giuliani A., Erenpreisa J., Huang S., Salmina K., Inashkina I., Huna A., Nikolsky N. N, Vinogradov A. E. Somatic polyploidy is associated with the upregulation of c-MYC interacting genes and EMT-like signature //Oncotarget. 2016. Vol. 7. № 58. P. 75235-75260.*
5. *Wu C., Jin X., Tsueng G., Afrasiabi C., Su A. I. BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles//Nucleic Acids Res. 2016. Vol. 44. P. D313-316.*

СЕКЦИЯ

БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ

SECTION

BIOGEOTECHNOLOGY

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 622.7: 622.342.1

ДОСТИЖЕНИЯ В ОБЛАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ МИНЕРАЛЬНОГО СЫРЬЯ ЦВЕТНЫХ И БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ

Седельникова Г.В.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Центральный научно-исследовательский геологоразведочный институт цветных и благородных металлов» (ФГУП ЦНИГРИ), Москва, Россия
117545, Москва, Варшавское шоссе, 129, корп. 1
e-mail: gsedelnikova@mail.ru

Рассмотрены достижения в области кучного выщелачивания меди из бедных руд и чанового биоокисления концентратов золота и цветных металлов, даны рекомендации по освоению отечественной минерально-сырьевой базы с использованием биотехнологии.

Ключевые слова: кучное биовыщелачивание, медь, биоокисление, концентраты золота, цветные металлы.

Во всем мире проводятся исследования и разрабатываются технологии по применению микроорганизмов для извлечения металлов из минерального сырья: кучное (подземное) бактериальное выщелачивание меди из бедных руд, чановое биоокисление золотосульфидных, медных, никелевых, цинковых, кобальтовых и др. концентратов. Наибольшее промышленное использование получили технологии кучного бактериального выщелачивания меди и чанового биоокисления золотосульфидных концентратов.

Впервые кучное бактериальное выщелачивание меди в большом масштабе было осуществлено в 1980г. на руднике Lo Aguirre компании Socieddad Minera Pudahuel (Чили) из руды с содержанием 1% и получением катодной меди по технологии с экстракцией и электролизом (SX-EW). Вскоре технология была внедрена на 17 предприятиях, в том числе на 10 рудниках в Чили, а также США, Перу, Австралии. В настоящее время с использованием кучного бактериального выщелачивания добывается около 25% меди на 24 предприятиях (к выше перечисленным странам добавились Мексика, Китай, Мьянма, Болгария и др.). Наиболее эффективно медь извлекается из руд, в которых она находится в основном в форме вторичных сульфидов (халькозин, ковеллин, борнит). Халькопиритовые руды и концентраты окисляются значительно хуже. Для повышения скорости окисления халькопирита исследуются различные методы: режим чанового выщелачивания, применение термофильных микроорганизмов, иммобилизированных железоокисляющих бактерий и др. Внедрение биогидрометаллургической технологии переработки халькопиритовых концентратов сдерживается минимальными экономическими преимуществами ее перед традиционной пирометаллургической технологией. По мнению специалистов компании, Mintek (основных разработчиков этой технологии), наиболее подходящими объектами для биовыщелачивания являются низкосортные медные и медно-никелевые концентраты, содержащие вредные примеси. Положительным примером является предприятие Mondo Minerals Talc operation (Финляндия), на котором биовыщелачиванию подвергают никель-кобальтовый мышьяксодержащий концентрат.

Несмотря на большой объем исследований и опытно-промышленных работ, выполненных на ряде месторождений России (Дегтярское, Волковское, Николаевское, Блявинское и др.) кучное выщелачивание меди в отечественной практике практически не используется. Значительные запасы меди в

месторождениях с бедными рудами выдвигают задачу создания и промышленного освоения технологии кучного бактериального выщелачивания меди и др. металлов с учетом последних достижений биогидрометаллургии.

Технология чанового биоокисления упорных золотосодержащих сульфидных концентратов, характеризующихся тонкой вкрапленностью золота в сульфидах и наличием органического углерода. Промышленная биогидрометаллургическая переработка упорных золотосульфидных концентратов ведется с 1986г. на 19 предприятиях: Ганы (2), Китая (8), Австралии (3), Южной Африки (2), России, Казахстана, Узбекистана и Филиппин (по 1-ому предприятию в каждой стране). В России биогидрометаллургическая технология разработана и внедрена в 2000 г. на Олимпиадинском ГОКе, (ЗАО «Полюс»). Большинство действующих предприятий по биокислению упорных золотосульфидных концентратов введены в эксплуатацию в последние 15 лет и успешно работают, что свидетельствует об эффективности биотехнологии и ее мировом признании. Одним из недостатков технологии является большая продолжительность процесса. Совершенствование технологии осуществляется на базе научных и прикладных исследований по изысканию эффективных микроорганизмов, а также в направлении совершенствования биогидрометаллургических процессов и оборудования, охраны окружающей среды, сокращения капитальных и эксплуатационных затрат. В качестве последних достижений мировой практики технологии биоокисления упорных золотосульфидных концентратов можно привести два примера. Первый – новое предприятие третьего поколения технологии BIOX® (BIOMIN, ныне «Outotec») – золото-молибденовый проект Runruno на Филиппинах, введенный в эксплуатацию в 2015г. с проектной производительностью 404 т концентрата в сутки. Второй – Олимпиадинский ГОК, на котором осуществляется переработка упорной золотосодержащей руды (11,5 млн.т. руды в год) с получением концентрата и последующим его биоокислением (1500 т/сутки). Наличие запасов упорных руд золота в РФ обуславливают необходимость развития дальнейших исследований по разработке и распространению технологии биоокисления золотосульфидых концентратов в отечественную золотодобывающую промышленность.

Одним из достижений в области экологии биогидрометаллургической переработки минерального сырья является промышленное внедрение нового метода – бактериальной очистки промышленных стоков цианирования от цианидов и тиоционатов (технология ASTERтм, BIOMIN) для повторного использования воды в технологии биоокисления золотосульфидных концентратов. В России такая технология отсутствует.

Принимая во внимание имеющуюся в России минерально-сырьевую базу, последние мировые достижения в области применения биотехнологии для извлечения металлов из руд, а также положительные результаты исследований отечественных ученых, необходимо расширить НИОКР в направлении разработки и внедрения передовых биотехнологий в минерально-сырьевой комплекс страны.

ACHIEVEMENTS IN THE FIELD OF RESEARCH AND INDUSTRIAL MINERAL PROCESSING BIOTECHNOLOGY OF BASE AND PRECIOUS METALS

Sedelnikova G.

Central research institute of geological prospecting for base and precious metals (TsNIGRI), Moscow, Russia
117545, Moscow, Varshavskoye sh., 129, k.1
e-mail: gsedelnikova@mail.ru

The following article considers the achievements in the heap leaching of copper ores and the vat biooxidation of gold sulfides and other concentrates, and provides recommendations for the exploration of domestic mineral resources base using biotechnology.

Key words: heap bioleaching, copper, biooxidation, concentrates, gold, base metals.

All over the world, research is conducted and technologies are developed to use microorganisms for metal extraction from minerals. These are heap (underground) bacterial leaching of low-grade copper ores and tank biooxidation of gold sulfide, copper, nickel, zinc, cobalt and other concentrates. The most widely used industrial technologies are bacterial heap copper leaching and tank biooxidation of gold sulfide concentrates.

The first heap bacterial copper leaching on a large scale was carried out in the mine Lo Aguirre owned by the company Socieddad Minera Pudahuel (Chile) in 1980. The cathode copper was recovered through the solvent extraction and electro winning technology (SX-EW), using 1% ore. The technology was soon implemented at 17 plants. Among them are 10 mines in Chile, the United States, Peru, and Australia. Currently, about 25% of copper at 24 plants is

produced by means of heap bacterial leaching (Mexico, China, Myanmar, Bulgaria and others joined the above listed countries). Copper is most effectively extracted from the ores in which it is contained mainly in the form of secondary sulphides (chalcocite, covellite, and bornite). Chalcopyrite ores and concentrates oxidize significantly worse. To increase the rate of chalcopyrite oxidation, various methods are being explored: tank-leaching process, use of thermophilic microorganisms and immobilized iron-oxidizing bacteria, etc. The implementation of biohydrometallurgical technology of chalcopyrite concentrate processing is restrained by its minimum economic benefits in comparison with the traditional pyrometallurgical technology. According to the experts of Mintek company (the main developer of the technology), the most suitable for bioleaching are low-grade copper and copper-nickel concentrates containing harmful impurities. A positive example is talc operation by Mondo Minerals (Finland) where the nickel and cobalt concentrate containing arsenic is subjected to bioleaching.

Despite the considerable amount of research and pilot industrial projects carried out in a number of Russian deposits (Degtyarskoye, Volkovskoye, Nikolaevskoe, Blyavinskoe, etc.), heap copper leaching is rarely used in the domestic practice. Significant copper reserves in low-grade ore deposits put forward the task of creation and industrial development of bacterial heap leaching to recover copper and other metals in view of the recent biohydrometallurgy achievements.

The tank biooxidation technology of refractory gold sulfide concentrates characterized by fine gold inclusions of sulfides and the presence of organic carbon. Since 1986, industrial biohydrometallurgical processing of the refractory gold sulfide concentrates has been conducted at 19 plants in Ghana (2), China (8), Australia (3) South Africa (2), Russia, Kazakhstan, Uzbekistan and the Philippines (one plant per country). In Russia, the biohydrometallurgical technology was developed and implemented in 2000 at Olimpiadinsky Ore Mining and Processing Plant (ZAO «Polyus»). The majority of the operating plants accomplishing the biooxidation of refractory gold sulfide concentrates have been commissioned in the last 15 years and are working successfully. This demonstrates the efficiency of biotechnology and its worldwide recognition. One of the technology shortcomings is a long duration of the process. The technology is being improved based on scientific and applied research on finding effective microorganisms, as well as in the direction of improving biohydrometallurgical processes and equipment, environmental protection, capital and operating costs reduction. Two relevant examples of the latest world achievements in biooxidation technology of refractory gold sulfide concentrates can be mentioned. The first one is a new plant of the third generation technology BIOX® (BIOMIN, now Outotec). This is a gold-molybdenum Runruno project in the Philippines, commissioned in 2015, with a project efficiency of 404 tons of concentrate per day. The second one is the Olimpiadinsky Ore Mining and Processing Plant. Here the refractory gold ore is processed (11.5 million tons of ore per year) and a concentrate is produced, followed by the biooxidation (1500 tons/day). The availability of refractory gold ore reserves in Russia require further research to elaborate and expand the biooxidation technology of gold sulfide concentrates to the domestic gold mining industry.

One of the achievements in the field of mineral processing biohydrometallurgical ecology is industrial application of the new method – the bacterial refining of cyanide industrial wastewater from the cyanides and thiocyanates (ASTER™ technology, BIOMIN) for water reuse in the biooxidation technology of gold sulfide concentrates. There is no such technology in Russia.

Taking into account the existing mineral base in Russia, the latest world achievements in the field of biotechnology for metal extraction from ores, as well as the positive research results achieved by the Russian scientists, there is a need to expand research and development with regard to advanced biotechnology elaboration and implementation in the mineral resource industry sector of the country.

УДК 66.061.34+579.66

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РАЗНООБРАЗИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В БИОГЕОТЕХНОЛОГИИ

Булаев А.Г.[1,2]

[1]Институт 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
[2]Биологический 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 разнообразии микроорганизмов, используемых в различных биогидрометаллургических технологиях, таких как технологии биовыщелачивания (биоокисления) сульфидных руд и концентратов, технологии очистки сточных вод от сульфатов и ионов тяжелых металлов и технологии очистки сточных вод от цианидов и тиоцианатов.

Ключевые слова: биогидрометаллургия; ацидофильные микроорганизмы; биовыщелачивание сульфидных минералов, сульфатредукция, разложение тиоцианата.

В настоящее время в гидрометаллургии используются различные процессы, основанные на активности микроорганизмов. Микробные биогидрометаллургические технологии включают технологии биовыщелачивания (биоокисления) сульфидных руд и концентратов, технологии очистки сточных вод от сульфатов и ионов тяжелых металлов и технологии деструкции цианидов и тиоцианатов. Биотехнологии переработки сульфидных руд и концентратов основаны на активности ацидофильных микроорганизмов, использующих в качестве энергетического субстрата двухвалентное железо и серу и способных окислять сульфидные минералы. Наиболее известным и изученным видом является бактерия Acidithiobacillus ferrooxidans (ранее Thiobacillus), способная окислять и двухвалентное железо, и серу. Показано, что в биогидрометаллургических процессах зачастую преобладают другие виды микроорганизмов (в общей сложности около 20 видов). Данные микроорганизмы филогенетически неоднородны (т.е. неродственны друг другу), однако обладают общими физиологическими свойствами: являются ацидофилами; используют для энергетического метаболизма двухвалентное железо, серу и ее восстановленные соединения; устойчивы к ионам тяжелых металлов [1]. Одним из наиболее перспективных методов очистки кислых сточных вод металлургии от сульфатов и ионов тяжелых металлов являются активные биологические системы очистки рудничных вод, основанные на использовании сульфатредуцирующих бактерий (СРБ). СРБ вырабатывают сероводород из сульфатов, содержащихся в сточных водах, что ведет к осаждению содержащихся в стоках металлов, которые затем могут быть извлечены в виде богатого сульфидного концентрата. Изучение разнообразия СРБ и поиск их представителей, устойчивых к неблагоприятным факторам (низкий pH, высокие концентрации металлов), является основой для совершенствования существующих технологий. Исследования последних лет позволили расширить представление о разнообразии экстремофильных СРБ, обладающих необходимыми для технологии свойствами [2]. Технологии обезвреживания растворов цианидов и тиоцианатов, образующихся в процессах цианирования золотых руд, также являются важным направлением биогидрометаллургии, так как рядом исследований показано, что ПДК по цианиду и его производным в обезвреживаемых растворах зачастую удается достичь только с помощью методов микробиологической очистки. Показано, что к деструкции цианида способны представители нескольких родов бактерий, включая Actinomyces, Alcaligenes, Arthrobacter, Azotobacter (A. chroococcum), Bacillus, Micrococcus, Neisseria, Paracoccus, Pseudomonas и Thiobacillus [3]. Таким образом, существующие биогидрометаллургические технологии основаны на активности различных групп микроорганизмов, изучение которых является актуальным направлением микробиологии и позволяет расширить общие представления о разнообразии микроорганизмов.

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.*

DIVERSITY OF MICROORGANISMS APPLIED IN BIOGEOTECHNOLOGY

Bulaev A.G.[1,2]

[1] *Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences. Moscow, Russia*
119071 Moscow, 33, bld. 2 Leninsky Ave.
[2] *Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia*
119071 Moscow, 1, bld. 12 Leninskiye Gory.
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Data on the diversity of microorganisms applied in different biohydrometallurgical technologies such as bioleaching (biooxidation) of sulfide ores and concentrates, removal of sulfates and heavy metals from waste waters, and destruction of cyanide and thiocyanate are presented.

Key words: biohydrometallurgy, acidophilic microorganisms, sulfide minerals bioleaching, sulfate reduction, thiocyanate destruction

Currently, different processes based on activity of microorganisms are used in hydrometallurgy. Microbial biohydrometallurgical technologies include bioleaching (biooxidation) of sulfide ores and concentrates, removal of sulfates and heavy metals from waste waters, and destruction of cyanide and thiocyanate. Biotechnologies for treatment of sulfide ores and concentrates are based on activity of acidophilic microorganisms consuming ferrous iron and sulfur as energetic substrates and oxidizing sulfide minerals. The bacterium Acidithiobacillus ferrooxidans (previously Thiobacillus) able to oxidize both ferrous iron and sulfur is the most studied species among these microorganisms. It has been shown that other species of microorganisms (about 20 species) can predominate in biohydrometallurgical processes. These microorganisms are phylogenetically heterogeneous (i.e., unrelated) but possess common physiological properties: they are acidophiles, oxidize ferrous iron, sulfur and its reduced compounds, and resistant to heavy metals ions [1]. One of the most promising methods for removal of sulfates and heavy metals from acid wastewaters is application of active biological systems based on activity of sulfate-reducing bacteria (SRB). SRB produce hydrogen sulfide from the sulfate contained in wastewaters that results in precipitation of metals contained in these waters. Thus, these metals can be extracted as high-grade sulfide concentrate. Studying of the diversity of SRB and search of their representatives resistant to unfavorable factor (low pH, high concentrations of the metals) are the basis for improvement of applied technologies. Recent studies have made it possible to expand understanding of the diversity of extremophilic SRB possessing properties required for biotechnology [2]. Technologies of detoxification of cyanide and thiocyanate containing solutions produced during cyanidation of gold ores are also important branch of biohydrometallurgy since a numerous studies demonstrated that MPC of cyanide and its derivatives in the treated solutions could be achieved only using biological treatment. It has been revealed that several bacterial genera such as Actinomyces, Alcaligenes, Arthrobacter, Azotobacter (A. chroococcum), Bacillus, Micrococcus, Neisseria, Paracoccus, Pseudomonas, and Thiobacillus are capable of cyanide destruction [3]. Thus developed biohydrometallurgical technologies are based on activity of different groups of microorganisms and their studying is relevant issue of microbiology and makes it possible to expand understanding of microbial diversity.

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.*

.....

УДК 622.765.061.28.541.18

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ В ПОДБОРЕ РАСТВОРИТЕЛЕЙ МИНЕРАЛОВ В ПРОЦЕССАХ БИОГЕОТЕХНОЛОГИИ

Соложенкин П.М.

Государственное бюджетное научное учреждение Институт проблем комплексного освоения недр Российской академии наук (ИПКОН РАН),Москва, Россия
111020,Москва , Институт проблем комплексного освоения недр, Крюковский Тупик, 4
e-mail: solozhenkin@mail.ru

Показана эффективность компьютерных технологии и химических программ для выбора растворителей сульфидных минералов висмута и сурьмы в процессах биогеотехнологии.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, выбор растворителя ,минералы висмута и сурьмы.

Анализируется положение, что растворимость минерала связана с переносом заряда растворителя

к минералу. По известным уравнениям вычислены : абсолютная жесткость, электроотрицательность и степень переноса заряда для минералов Cu, Bi и Sb.

Установлено, что растворимость минералов сульфатом железа((III) соответствует ряду Cu2Fe2S4< Cu_2CuS_2S < Cu_2S . Теоретические данные соответствуют практическим результатам .

Приведены результаты молекулярного моделирования кластеров минералов висмута, таких как тетрадимит Bi_2Te_2S, галеновисмутит $PbBi_2S_4$, айкинит $CuPbBiS_3$. Для перевода висмутина Bi2S3 в жидкую фазу приведены реакции с участием различных растворителей типа HCl , H_2SO_4, FeC1₃, $Fe_2(SO_4)_3$. Анализируется степень переноса заряда различных растворителей при их взаимодействии с минералами висмута . Установлено, что степень переноса заряда для хлорного железа больше, чем для сульфата железа(III). Для висмутина степень переноса заряда меньше , чем для тетрадимита TeBiSBiTe и гуанахуатита SeSeBi₂Se. Полученные результаты соответствуют практики выщелачивания висмутовых минералов.

Рассмотрены комплексные сурьмосодержащие объекты России, как источники производства сурьмы. Изучали наряду с антимонитом, бертъеритом , гудмундитом, плагоонитом , весьма редкие минералов сурьмы ,типа ульманита NiSbS, виллиамита (Co,Ni)SbS, костибита CoSbS, брейтгауптит NiSb , халькостибит $CuSbS_2$.

Автор использовал для перевода антимонита в жидкую фазу растворы FeC1₃, $SbCl_5$, тетрафтороборную HBF4 кислоту. Применение раствора пентахлорида сурьмы, более эффективно, чем $FeCl_3$, так как исключается возможность загрязнение триоксида сурьмы ионами железа в процессе гидролиза.

Степень переноса заряда для системы $Sb2S_3$+$FeCl_3$ больше на 0,041 е, чем для Sb_2S_3+ $Fe_2(SO_4)_3$, и на 0,047е для Sb_2S_3+ $Fe(BF_4)_3$, т.е. хлорное железо (Ш) и $Fe(BF_4)_3$ более эффективные растворители для сульфида сурьмы, чем сульфат железа (III).

Анализируются природа комплексов золота при сульфидно- щелочном выщелачивания Sb, Au концентратов. Показано возможность образования комплексов золота в основном шести типов.

1.Гидросульфидные комплексы золота типа :$Au(HS)^{2-}$, Au2S(HS)⁻; $[Au_2(HS)_2S]^{2-}$, $(HSAuSAuSH)_2$,$HAu(HS)_2$;

2.Тиосульфатные комплексы золота $Na_3AuS_4O_6$. 3.Антимонатные комплексы золота : триоксид сурьмы(III)и тетраоксид сурьмы(V) золота типа :Au_3SbO_3, Au_3SbO_4. 4.Арсенатные комплексы золота : метаарсенит золота AuOAsO , Au_3AsO_3, арсенат золота Au_3AsO_4.

5.Тритиостибат(III) золота типа: Au_3SbS_3 и тетратиостибат (V) золота Au_3SbS_4.

6.Тритиоарсенат(III) золота типа : Au_3AsS_3 и тетратиоарсенат(V) золота Au_3AsS_4.

Установлено, что степень переноса заряда характеризует активность растворителей при комплексной переработке руд цветных и благородных металлов.

Литература:
1. Соложенкин П.М., Шавакулева О.П., Мудрых Н.А., Соложенкин О.И.
Компьютерное моделирование флотореагентов и кластеров минералов. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. Магнитогорский государственный технический университет им. Г.И. Носова « (ФГБОУ ВПО «МГТУ») ,Магнитогорск 2014, 263с

.....

УДК 622.765.061.28.541.18

COMPUTER REPRESENTATIONS IN SELECTION OF SOLVENTS OF MINERALS IN BIOGEOTECHNOLOGY PROCESSES

Solozhenkin P. M.

The state budgetary scientific institution Institute of problems of complex development of bowels of the Russian Academy of Sciences
111020, Moscow, Institute of problems of complex development of bowels, Krjukovsky Tupic, 4.
e-mail: solozhenkin@mail.ru

Efficiency computer is shown technology and chemical programs for a choice of solvents of sulphidic minerals of bismuth and Antimony in biogeotechnology processes.

Key words: molecular modelling, a solvent choice, bismuth and antimony minerals

Theoretical bases of construction 3D molecular models for the cores cluster bismuth and antimony minerals are created. Position is analyzed, that solubility of a mineral is connected with carrying over of a charge of solvent to a

mineral. On the known equations are calculated: absolute rigidity, electronegativity and degree of carrying over of a charge for minerals Cu, Bi and Sb.

It is established, that solubility of minerals iron sulphate (III) corresponds to number $Cu_2Fe_2S_4$ <Cu_2CuS_2S <Cu_2S. Theoretical data correspond to practical results.

Results of molecular modeling clusters minerals of bismuth, such as tetradymite Bi_2Te_2S, galenobismutite, aikinite $CuPbBiS_3$ are resulted. For transfer bismuthine Bi_2S_3 in a liquid phase reactions with participation of various solvents of type HCl, H_2SO_4, FeC1$_3$, $Fe_2(SO_4)_3$ are resulted. Degree of carrying over of a charge of various solvents is analyzed at their interaction with bismuth minerals. It is established, that degree of carrying over of a charge for chloric iron more than for sulphate of iron (III). For bismuthine degree of carrying over of a charge is less, than for TeBiSBiTe and guanajuatite SeSeBi$_2$Se. The received results correspond experts leaching bismuth minerals.

It is considered complex antimony-bearing objects of Russia, as sources of manufacture of antimony. Studied along with antimonite, berthierite, gudmundite, plagionite, rather rare minerals of antimony, type ylmanite NiSbS, filliamite (Co, Ni) SbS, costibite CoSbS, breitgauptite NiSb, chalkostibiteCuSbS$_2$.

The author used for transfer antimonite in a liquid phase solutions FeC1$_3$, $SbCl_5$, tetraftorbore HBF_4 acid. Solution application pentachloral antimony, more effectively, than $FeCl_3$ as possibility pollution trioxide antimony by ions of iron in the course of hydrolysis is excluded.

Interaction reactions between minerals of antimony of the Olimpiadinsky deposit and $FeCl_3$ are resulted.

Degree of carrying over of a charge for system Sb2S$_3$+$FeCl_3$ is more on 0,041 e, than for Sb_2S_3 + $Fe_2(SO_4)_3$, and on 0,047e for Sb_2S_3 + Fe $(BF_4)_3$, i.e. chloral iron and Fe $(BF_4)_3$ more effective solvents for antimony sulfide, than sulfate of iron (III).

Are analyzed the nature of complexes of gold at sulfide-alkaline leaching Sb, Au concentrates. It is shown possibility of formation of complexes of gold in the basic six types.

1. Hydrosulfidic complexes of gold of type : Au $(HS)^{2-}$, Au2S $(HS)^-$; $[Au_2(HS)_2S]_2$, $(HSAuSAuSH)_2$, $HAu(HS)_2$;

2. The thiosulfide complexes of gold $Na_3AuS_4O_6$. 3. Antimony gold complexes: trioxide antimony (III) and тетраоxide antimony (V) gold of type: Au_3SbO_3, Au_3SbO_4. 4. arsenate gold complexes: metaarsenate gold AuOAsO, Au $_3AsO_3$, aarsenate gold Au $_3AsO_4$.

5. Trithiostibat (III) gold of type: Au_3SbS_3 and tetrathiostibat (V) gold Au_3SbS_4.

6. Trithioarsenate (III) gold of type: Au_3AsS_3 and tetrathioarsenate (V) gold Au_3AsS_4.

The method of an estimation of the forecast of activity of solvents for increase of extraction of bismuth from copper – bismuth ores and antimony from antimonic ores is offered.

It is established, that degree of carrying over of a charge characterizes activity of solvents at complex processing of ores non ferrous and precious metals

References:
1. Solozhenkin P. M, Shavakuleva O. P, Mudryh N.A., Solozhenkin O. I.
Computer modelling flotation of reagents and clusters minerals. The manual for students of higher educational institutions.
Magnitogorsk state technical university of G.I.Nosova « (FSBOU HPO «MGTU»), Magnitogorsk 2014, 263p

.....

УДК 579.66

РАЗВИТИЕ ПРОИЗВОДСТВА ПЕРЕРАБОТКИ КОНЦЕНТРАТОВ РУД МЕСТОРОЖДЕНИЯ ОЛИМПИАДИНСКОЕ ПО ТЕХНОЛОГИИ «BIONORD»

Белый А.В., Чернов Д.В., Солопова Н.В.

Исследовательский Центр АО «Полюс»,
660061, Цимлянская, 37, Красноярск, Россия.
e-mail: BelyiAV@polyusgold.com

Рассматривается поступательное наращивание производства переработки золотомышьяковистых руд месторождения «Олимпиадинское» с высоким содержанием пирротина на основе технологии «BIONORD», в условиях крайнего Севера.

Ключевые слова: биоокисление, ассоциация хемолитоавтотрофных микроорганизмов, технология «BIONORD», упорные золотомышьяковистые руды, флотоконцентрат, биореактор.

Первый промышленный цех по биоокислению упорных золотосодержащих руд, с использованием ас-

социации хемоавтотрофных микроорганизмов, в России был запущен на Олимпиадинской золотоизвлекательной фабрике (ОЗИФ) в 2001 году. Цех был оснащен 5 линиями по 6 реакторов в каждой. Емкость каждого биореактора составляла 440 м3. Фабрика была рассчитана на переработку 3 млн. тонн первичной сульфидной руды карьера «Восточный» месторождения «Олимпиадинское».

Аналогов такого производства в России не было, поэтому одновременно с производственными задачами решались и осваивались чисто технологические задачи. Это контроль и управление процессом биоокисления, определение граничных значений таких параметров процесса как плотность пульпы, оптимальная крупность помола флотоконцентрата, скорости протока, температуры, pH, обороты перемешивающего устройства, расход воздуха. Исследовались различные конструкции импеллеров перемешивающих устройств, конструкции систем аэрирования, системы дозирования поступающего питания в загрузочные реактора, технологические схемы соединений реакторов в линиях.

На основе имеющегося опыта при эксплуатации цеха БИО-1, было принято решение о расширении передела БИО. В 2007 г. был запущен цех БИО-2 рассчитанный на переработку 5 млн. тонн первичной сульфидной руды. Суммарная мощность переработки в двух цехах БИО составила 8 млн. тонн сульфидной руды в год. Цех был оснащен 3 линиями по 6 реакторов в каждой. Емкость каждого реактора составляла 1000 м^3.

На БИО-2 отрабатывалась технология работы на реакторах большой емкости. Отрабатывалось оптимальное соотношение затрачиваемых мощностей на перемешивающие устройства и аэрацию. Испытывались новые конструкции системы дозирования пульпы по загрузочным реакторам, системы охлаждения.

На основе промышленной эксплуатации и анализа работы цехов БИО-1 и БИО-2 была разработана более совершенная концепция цеха БИО-3. Цех запущен в эксплуатацию в 2012 году и оснащен 1 линией с шестью 1000 м3 реакторами. В основу концепции была положена автоматизация процесса биоокисления с выводом контролирующих и управляющих параметров процесса на мониторы компьютеров в операторской. Это позволяло строго удерживать основные параметры процесса в заданных режимах, и дало возможность вести процесс в стабильном высокопроизводительном режиме.

Оснащение цехов БИО-1 и БИО-2 системой автоматизации, оправдавшей себя в эксплуатации в цехе БИО-3 позволило поднять производительность всех цехов с 870 т/сутки до 1150-1200 т/сутки по перерабатываемому флотоконцентрату. За счет этого в 2015 г было произведено свыше 25 тонн золота за счет использования технологии биоокисления золотосодержащих сульфидных флотоконцентратов.

В настоящий момент АО «Полюс» является правообладателем защищенных патентами технологий бактериальной переработки концентратов упорных золотосодержащих сульфидных руд, защищенной патентом ассоциацией микроорганизмов, осуществляющих этот процесс, а сама технология процесса защищена товарным знаком «BIONORD».

УДК 579.66

PRODUCTION DEVELOPMENT OF OLIMPIADINSKOYE DEPOSIT ORE CONCENTRATES «BIONORD» TECHNOLOGY PROCESSING.

Belyi A. V., Chernov D. V., Solopova N. V.

JSC Polyus research center,
660061, Tsymlyanskaya, 37, Krasnoyarsk, Russia.
e-mail: BelyiAV@polyusgold.com

The «BIONORD» technology processing of «Olimpiadinskoe» deposit arsenic-gold ore with high pyrrhotite content sustained production increasing in the extreme conditions of the Russian north is being considered.

Key words: bio-oxidation, chemolithoautotrophic bacteria association, «BIONORD» technology, hard arsenic-gold ore, flotation concentrate, bioreactor.

The first production facility in Russia of hard arsenic-gold ore bio-oxidation through chemolithoautotrophic bacteria association was commissioned at Olimpiada processing plant in 2001. The facility was equipped with 5 production lines of 6 reactors in each. Each bioreactor's capacity was 440 cubic meter. The processing plant was designed to have a production capacity to 3 million tons of «Vostochnyi» pit primary sulphide ore of «Olimpiadinskoe» deposit.

There were no similar operations in Russia that time, so that production and technological tasks were processing

simultaneously. Bioleaching process control, estimating the limit values of such parameters as pulp density, grind size optimization, flowrate, temperatures, pH, velocity and air consumption were among the existing technological tasks. Various designs of mixer impellers surveys, aeration system design research, feeder systems tastings and circuit reactor connections flow chart testing were conducted.

Related to BIO-1 workshop process experience, resolution about BIO workshop expansion was considered. BIO-2 workshop was commissioned in 2007 and it's throughput was 5 million tpa of ROM sulphide ore. There were 3 circuits and 6 reactors each. Volume of each reactor was 1000 cubic meter. Total throughput of workshops was 8 million tpa of ROM sulphide ore.

BIO-2 workshop operated performance of high capacity reactor technology and mixers and aeration system power draw balance optimization. New pulp feed system design and cooling system design researches were conducted.

Related to the operation experience and performance review of BIO-1 and BIO-2 workshops, an improved concept of BIO-3 workshop was developed. BIO-3 workshop with 1 circuits and 6 reactors 1000 cubic meter each was commissioned in 2012. The basis of the concept was bioleaching process automation with control parameters management from the control room. This allowed for main parameters control within user-specified conditions, and enabled stable and effective process performance.

Implementation of BIO-3 well proven automation system in BIO-1 and BIO-2 workshops increased flotation concentrate throughput of all workshops from 870 tpd to 1150-1200 tpd. Thus over 26 tons of gold produced in 2015 due to gold ore flotation concentrates bioleaching technology.

JSC Polyus is a holder of rights of refractory gold ore flotation concentrates bioleaching technologies under patents, processing culture collections of microorganisms under patents and process technology is protected by trademark «BIONORD».

.....

УДК: 622,7:622.342.1

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ОТВАЛЬНЫХ ЗОЛОТОСУЛЬФИДНЫХ РУД МЕСТОРОЖДЕНИЯ КОКПАТАС РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

Сагдиева М.Г., Калиниченко З.В., Мирталипов Д.Я.

Государственное предприятие «Научно-исследовательский институт минеральных ресурсов», Ташкент, Республика Узбекистан
100060, Ташкент, ул. Т. Шевченко, дом 11 а
e-mail: msagdieva@mail.ru

Проведены укрупненно-лабораторные испытания по кучному биовыщелачиванию отвальных руд месторождения Кокпата. Показана пригодность руды к переработке методом биотехнологии, после бактериальной обработки извлечение золота методом цианирования составляет 57,6-68,9%.

Ключевые слова: отвальные сульфидные руды, кучное биовыщелачивание, арсенопирит, пирит, железо- и серуокисляющие бактерии, сульфидная сера.

Резкое повышение цен на благородные и цветные металлы на мировом рынке и постоянно растущая потребность в металлах приводят к необходимости использования бедных руд месторождений, залегающих на больших глубинах, отвалов и отходов горнодобывающих предприятий. Проблема переработки отвальных забалансовых руд актуальна и для Государственного предприятия «Навоийский горно-металлургический комбинат» Республики Узбекистан. С 2008 года на Гидрометаллургическом заводе 3 (ГМЗ-3) запущена установка по биоокислению флотоконцентратов, полученных из руд месторождений Кокпатас и Даугызтау. На сегодняшний день количество отвальных забалансовых сульфидных руд только месторождения Кокпатас составляет около пятнадцати миллионов тонн. В связи с этим, в 2012 году были начаты научно-исследовательские работы по разработке биотехнологии кучного выщелачивания отвальных забалансовых руд месторождения Кокпатас. Проведены лабораторные и укрупнено-лабораторные испытания по биовыщелачиванию двух типов отвальных руд: отвальные забалансовые руды и отвальные сульфидные руды немашинного класса при классе крупности руды: -3+0; -10+0; и –25+0. Эксперименты проводили в биореакторах с массой руды 2,0 кг, 25,0 кг и 100,0 кг. Данные химического и рационального анализа\ов показывают, что золото, тонковкрапленное в породообразующие минералы, ассоциированное с углеродистыми веществами и тонковкрапленное в сульфидами, не поддается классическим методам

извлечения. В работе была использована ацидофильная ассоциация железо-серуокисляющих бактерий, выделенная из сульфидных руд месторождения Кокпатас. В процессе биовыщелачивания были определены влагоемкость, проницаемость, расход серной кислоты, а также основные параметры биовыщелачивания. Установлено, что биоокисление сульфидных минералов зависит от класса крупности: чем мельче руда, тем выше вскрытие золота. Результаты лабораторных и укрупненно-лабораторных испытаний показали, что, несмотря на высокую карбонатность отвальных забалансовых руд месторождения Кокпатас, метод кучного биовыщелачивания пригоден для переработки отвальных забалансовых сульфидных руд месторождения Кокпатас.

В процессе биовыщелачивания обоих типов отвальных забалансовых руд извлечение золота методом цианирования после бактериальной обработки увеличилось на 30–33% и составило 57,6-68,9%, что свидетельствует о перспективности разрабатываемой биотехнологии. На основании проведенных исследований и полученных данных разработан технологический регламент для проведения полупромышленных испытаний биотехнологии переработки отвальных руд месторождения Кокпатас на массе руды 100 тонн при классе крупности -15+0 мм.

BIOTECHNOLOGY OF PROCESSING DUMPING GOLD-SULFIDE ORES OF THE KOKPATAS DEPOSIT OF THE REPUBLIC OF UZBEKISTAN

M.G. Sagdieva., Z.V. Kalinichenko, D.Ya. Mirtalipov

State Enterprise «Scientific Research Institute of Mineral Resources», Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100060, T.Shevchenko Str., 11/A
e-mail: msagdieva@mail.ru

Conducted enlargement and laboratory tests on biological heap-leaching dump Kokpata ore deposits. Shown ore recyclability by biotechnology, after bacterial treatment gold recovery by cyanidation is 57,6-68,9%

Key words: dumping sulfide ore, heap bioleaching, arsenopyrite, pyrite, iron and sulfur oxidized bacteria, sulfide sulfur.

The sharp rise in prices for precious and non-ferrous metals on the world market and growing demand for metals lead to the need for low-grade ore deposits that lie at great depths, dumps and mining waste.

The problem of recycling dump balance ores relevant for the State Enterprise «Navoi Mining and Metallurgical Enterprise» of the Republic of Uzbekistan. Since 2008 Hydrometallurgical Plant 3 (GMZ-3) launched biooxidation plant for flotation concentrate produced from ore deposits Kokpatas and Daugyztau. For today , the amount of off-balance dump sulfide ore deposits Kokpatas only makes about fifteen million tons. In this regard, in 2012 were initiated research work on the development of biotechnology heap leach dump balance ores Kokpatas field.

Laboratory and enlarged-laboratory tests were carried out on the two types of dump leaching ores dumping balance ores and sulfide ores dumping non-machinic class size when the ore grade: -3 + 0; -10 + 0; -25 and + 0. Experiments were performed in bioreactors ore with 2.0 kg weight, 25.0 kg and 100.0 kg. These chemical and rational analysis show that gold, finely disseminated in the rock-forming minerals, associated with carbonaceous material and finely disseminated sulphides in, can not be a classical extraction methods. The paper was used acidophilic association iron sulfur oxidized bacteria , isolated from sulfide ores of Kokpatas field.

In the process of bioleaching were determined moisture content, permeability, flow of sulfuric acid, as well as the main parameters of bioleaching. It is found that the bio-oxidation of sulphide minerals is dependent on the class size: the smaller the ore, the faster opening of gold. Results of laboratory and enlargement and laboratory tests have shown that, despite the high carbonate content of dump off-balance ore deposits Kokpatas, method of heap bioleaching recyclable dump off-balance sulfide ores Kokpatas field.

In the process of bioleaching of both types of off-balance ore dump gold recovery by cyanidation after bacterial treatment has increased by 30-33% to 57,6-68,9%, indicating that the prospects developed by biotechnology. Based on the studies and findings developed technological regulations for semi-industrial tests of biotechnology processing dump ore deposits in the ore Kokpatas weight of 100 tons, with class size -15 +0 mm.

УДК 622.7: 622.342.1

ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ВЫСОКОСУЛЬФИДНОГО ЗОЛОТОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Ким Д.Х., Ибрагимова Н.В., Владыкин А.Ю., Куликов Е. В., Седельникова Г.В.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Центральный научно-исследовательский геологоразведочный институт цветных и благородных металлов» (ФГУП ЦНИГРИ), Москва, Россия
117545, Москва, Варшавское шоссе, 129, корп. 1
e-mail: gsedelnikova@mail.ru

Установлены особенности и разработаны рекомендации по интенсификации биоокисления высокосульфидного золотосодержащего сырья методами кучного и чанового бактериального выщелачивания с применением ассоциации микроорганизмов.

Ключевые слова: высокосульфидное золотосодержащее сырье, кучное, чановое биоокисление, микроорганизмы.

В процессе кучного и чанового биоокисления упорного высокосульфидного золотосодержащего сырья (более 50% сульфидов, в основном пирит) в выщелачивающих бактериальных растворах (БР) происходит накопление ионов железа и цветных металлов, энергетических субстратов, а также изменение физико-химических параметров БР (pH, Eh), которые приводят к изменению количественного и качественного состава ассоциации микроорганизмов и жизнедеятельности бактерий.

Так, при кучном бактериальном выщелачивании (КБВ) высокосульфидных золотосодержащих хвостов флотации полиметаллических руд ассоциацией микроорганизмов Acidithiobacillus (A.ferrooxidans и A.thiooxidans), Leptospirillum (L.ferrooxidans), Sulfobacillus (S.thermosulfidooxidans), а также архебактерии рода Ferroplasma (F. Acidiphilum) установлено, что степень биоокисления сульфидов составляет 50-53%. В БР накапливается железо свыше 25 г/л, pH уменьшается с 2,2 до 1,4-1,5. Это приводит к резкому снижению активности бактерий A.ferrooxidans, являющихся основным штаммом при биоокислении сульфидов. Смена выщелачивающих бактериальных растворов позволяет восстановить активность микроорганизмов и интенсифицировать процесс окисления на второй стадии кучного бактериального выщелачивания. В течение 150 суток достигается довольно высокая степень биоокисления пирита 79,1-79,5%, минералов меди и цинка – 58,6% и 67,3%, соответственно. Извлечение золота из твердых остатков КБВ цианированием составляет 82,1% (без предварительного кучного бактериального выщелачивания – 34,1%) и меди из бактериальных растворов в цементную медь – 56,81%.

При чановом выщелачивании тонкоизмельченного высокосульфидного золотосодержащего сырья при Т:Ж=1:5 накопление в растворе выщелачивающих ионов железа и цветных металлов и изменение физико-химических параметров БР происходит более интенсивно, чем при кучном бактериальном выщелачивании. В течение 144 часов концентрация железа достигает 30 г/л, pH изменяется от 2,2 до 1,06. При этом доминирующая роль в биоокислении сульфидов после 100 часов выщелачивания переходит от мезофильных бактерий A.ferrooxidans и A.thiooxidans к умеренно-термофильным – S.thermosulfidooxidans, F. Acidiphilum и L.ferrooxidans. Регулирование температурного режима в течение всего процесса (до 100 часов – 32-360С, после – 38-400С) интенсифицирует биоокисление сульфидов и в течение 144 часов степень биоокисления сульфидов составляет 97,62%. Извлечение золота из твердых остатков биоокисления цианированием достигает 90,1% (без предварительного бактериального выщелачивания – 10,1%).

PECULIARITIES OF BACTERIAL OXIDATION OF HIGH GOLD-BEARING SULFIDE ORES

Kim D.H., Ibragimova N.V., Vladykin A.U, Kulikov E.V., Sedelnikova G.

Central research institute of geological prospecting for base and precious metals (TsNIGRI), Moscow, Russia
117545, Moscow, Varshavskoye sh., 129, k.1
e-mail: gsedelnikova@mail.ru

This article identifies the peculiarities and provides recommendations for intensification of biooxidation of high rate

gold-bearing sulfide ores by means of heap and tank bacterial leaching with the association of microorganisms.

Key words: high gold-bearing sulfide ores, heap, tank biooxidation, microorgsnisms.

During heap and tank biooxidation of refractory high gold-bearing sulfide ores (over 50% sulphides, mainly pyrite) ions of iron and non-ferrous metals as well as energy substrates, accumulate in leach bacterial solutions (BS). Physicochemical BS parameters (pH, Eh) change, which leads to changes in the qualitative and quantitative composition of the microorganisms association and bacteria activity.

Thus, it has been established that during the heap bacterial leaching (HBL) of high gold-bearing sulfide flotation tailings of polymetallic ores with the association of microorganisms: Acidithiobacillus (A.ferrooxidans and A.thiooxidans), Leptospirillum (L.ferrooxidans), Sulfobacillus (S.thermosulfidooxidans), as well as Ferroplasma archebacteria (F. Acidiphilum), a sulfide biooxidation degree is 50-53%. The iron accumulation in the BS is more than 25 g/l and pH decreases from 2.2 to 1.4-1.5. This leads to a drastic reduction in the activity of A.ferrooxidans bacteria, which are a major strain in the biooxidation of sulfides. Changing the bacterial leaching solutions allows restoring the activity of microorganisms and intensifying the oxidation process at the second stage of bacterial heap leaching. Within 150 days, rather high biooxidation degrees of pyrite 79.1-79.5%, of copper and zinc minerals – 58.6% and 67.3% respectively – are achieved. Gold recovery from the solid residues of HBL by cyanidation is 82.1% (without the preliminary bacterial heap leaching – 34.1%). Copper extraction from bacterial solutions to the cement copper is 56.81%.

In tank leaching of finely ground high rate gold-bearing ores at S:L = 1:5, the accumulation in the solution of leach iron ions and ions of non-ferrous metals as well as change in physical and chemical parameters of BS happens to be more intense than in bacterial heap leaching. Within 144 hours, the iron concentration reaches 30 g/l, pH decreases from 2.2 to 1.06. Meanwhile, after 100 hours of leaching, the dominant role in sulfide biooxidation is passed on from mesophilic bacteria A.ferrooxidans and A.thiooxidans to the moderately thermophilic bacteria – S.thermosulfidooxidans, F. Acidiphilum and L.ferrooxidans. Temperature adjustment throughout the entire process (up to 100 hours – 32-36°C, after 100 hours – 38-40°C) intensifies the biooxidation of sulfides, and within 144 hours, the degree of sulfide biooxidation reaches 97.62%. Gold recovery from biooxidation solid residues by cyanidation reaches 90.1% (without the preliminary bacterial leaching – 10.1%).

УДК 66.061.34+579.66

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ КОЛЛЕКТИВНЫХ СУЛЬФИДНЫХ МЕДНО-ЦИНКОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

Фомченко Н.В., Муравьев М.И.

Институт 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
e-mail: natalya.fomchenko@gmail.com

Исследованы одно- и двухстадийный процессы биогидрометаллургического выщелачивания медно-цинкового сульфидного концентрата. Показана возможность селективного удаления из него цинка с получением кондиционного медного концентрата.

Ключевые слова: биогидрометаллургия; выщелачивание; сульфидный концентрат; ацидофильные микроорганизмы.

Коллективные медно-цинковые концентраты, получаемые из колчеданных руд уральского региона, с трудом поддаются разделению на кондиционные цинковые и медные, пригодные для эффективных пирометаллургических процессов. Одним из способов их переработки могут быть биогидрометаллургические процессы, в частности, технология одностадийного биовыщелачивания, а также интенсивного двухстадийного биогидрометаллургического выщелачивания. Для исследования возможности селективного удаления цинка из медно-цинкового концентрата были использованы ассоциации хемолитотрофных микроорганизмов. Установлено, что в процессе биовыщелачивания в жидкую фазу переходил преимущественно цинк, а медь оставалась в твердой фазе, при этом скорость выще-

лачивания цинка достигала 257 мг/(л·сут), меди – 72.8 мг/(л·сут). Исследование первой стадии высокотемпературного биогидрометаллургического выщелачивания показало, что цинк выщелачивался со скоростью 127 г/(л·сут), а медь – 63.4 г/(л·сут); извлечение цинка в жидкую фазу достигало 83–96%, а меди 13.5–40%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что из исследуемого медно-цинкового концентрата цинк может быть полностью удален, а содержание меди в нем увеличено.

DEVELOPMENT OF A TECHNOLOGY OF BIOHYDROMETALLURGICAL TREATMENT OF COMPLEX SULPHIDE COPPER-ZINC CONCENTRATES

Fomchenko N.V., Muravyov M.I.

Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky Ave., 33/2
e-mail: natalya.fomchenko@gmail.com

One- and two-step processes of biohydrometallurgical leaching of copper-zinc sulfide concentrate were studied. The possibility of selective removing of zinc from the concentrate to produce grade copper concentrate was shown.

Key words: biohydrometallurgy; leaching; sulfide concentrate; acidophilic microorganisms

Separation of collective copper-zinc concentrates obtained from refractory ores of the Urals region on grade copper and zinc concentrates is connected with various technical difficulties. These grade concentrates could be produced using one-step bioleaching technology and intensive two-step leaching of collective concentrates. The consortia of acidophilic microorganisms were used for the investigation of selective leaching of zinc from a copper-zinc concentrate. Zinc was leached at first (up to 100%) than copper (only 21.5%) within the bioleaching experiments. Leaching rate of zinc was 257 mg/(l·day) and leaching rate of copper was 72.8 mg/(l·day). During the ferric leaching of the concentrate at elevated temperature (the first step of two-step process) the highest leaching rates of zinc and copper were 127 g/(l·day) and 63.4 g/(l·day), respectively; the recoveries of zinc and copper were 83–96% and 13.5–40%, respectively. The results were shown that zinc could be removed from the copper-zinc concentrate completely and content of copper could be increased.

УДК 579.66

ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ ОРОШЕНИЯ НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ ИЗ РУДЫ МЕСТОРОЖДЕНИЯ БАКЫРЧИК В УСЛОВИЯХ КУЧНОГО ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ

Канаев А.Т., Баймырзаев К.М., Булаев А.Г., Семенченко Г.В., Шемшеева Ж., Сулейменова Б.

Жетысуский государственный университет им.И.Жансугурова,
Казахстан, 040009, Талдыкорган, ул.И.Жансугурова,187а, e-mail: ashim1959@mail.ru

Проведены кучное выщелачивание упорных руд с использованием биовыщелачивания, которое предусматривает двухстадиальную схему переработки: на первой стадии провели биовыщелачивание, цель которого – вскрытие руды с помощью A.ferrooxidans, на второй – собственно выщелачивание благородного металла.

Ключевые слова: биовыщелачивание; руда; концентрация; бактерия; месторождения.

Предыдущими исследованиями, проведенными в 2015 году, был детально отработан второй этап выщелачивания: определен наиболее эффективный растворитель благородных металлов, его оптимальная концентрация, плотность орошения, введение пауз в орошении, разработаны основные этапы выщелачивания. В текущем году внимание было уделено первому этапу переработки руды – биовыщелачиванию. Определены эффективные концентрации бактерий, их активность накопления

трехвалентного железа. Для проведения укрупнено-лабораторных испытаний остается определить оптимальную плотность орошения руды при биовыщелачивании. На данном этапе переработки руды основной задачей является наиболее полное разрушение золотовмещающих минералов, которое достигается орошением руды бактериальным раствором с максимальным титром бактерий и концентрацией трехвалентного железа, что, в свою очередь, требует довольно значительных расходов на приобретение ингредиентов питательных сред. Поэтому на производстве, как правило, из соображений экономии определяют оптимальные параметры процесса.

Установлено, что наименьшая скорость протока бактериального раствора при плотности орошения 100 г/л способствует более быстрому оседанию бактерий на частицах руды, о чем свидетельствует более насыщенная ее окраска. Концентрация трехвалентного железа в данном случае постепенно снижается и стабилизируется на уровне 2,5 г/л. При высокой скорости протока процесс идет стабильно на более высокой концентрации трехвалентного железа – 6 г/л.

Для выбора эффективной плотности бактериального орошения после биовыщелачивания проводили химическое выщелачивание тиосульфатом в концентрации 15 г/л в течение 18 суток с плотностью орошения 25 л/т сутки. Концентрация золота в растворах выщелачивания постепенно снижается, тогда как концентрация мышьяка после двухнедельного снижения начинает возрастать.

При этом, усредненные значения концентрации золота возрастают по мере увеличения интенсивности бактериального орошения, превышая контрольные варианты в 2,7 – 3 раза, что отражается в увеличении извлечения золота в раствор. Средние значения концентрации мышьяка в опытных вариантах наоборот, ниже контрольных в среднем в 1,2 -1,8 раз.

UDC 579.66

INFLUENCE OF THE DENSITY OF IRRIGATION ON THE RECOVERY OF PRECIOUS METALS FROM ORES OF BAKYRCHIK IN TERMS OF HEAP LEACHING

Kanaev A. T., Baimyrzaev K. M. Bulaev, A. G., Semenchenko G. V., Shemsheeva Zh., Suleimenova B.

Zhetysu State University named after I. Zhansugurov
The Republic of Kazakhstan, 040009, Taldykorgan, Zhansugurov St., 187a, e-mail: ashim1959@mail.ru

Conducted heap leaching refractory ores using bioleaching, which includes two-stage processing scheme: in the first stage the spent bioleaching, which aims – opening of the ore by A. ferrooxidans, the second – the actual leaching of the noble metal.

Key words: bioleaching; ore; concentration; bacteria; deposits.

Previous researches carried out in 2015, were exercised thoroughly, the second stage leaching: determine the most effective solvent of the noble metals, its optimum concentration, the density of irrigation, the introduction of pauses in the irrigation developed by the main stages of leaching. This year attention was paid to the first stage of processing ore to bioleaching. The effective concentration of the bacteria, their activity accumulation of ferric iron. For holding the enlarged-laboratory tests remains to determine the optimal density of irrigation of the ore in bioleaching. At this stage of the ore processing main task is the complete destruction of gold included minerals, which is achieved by irrigation of the ore with the bacterial solution with a maximum titer of bacteria and the concentration of ferric iron, which in turn requires significant expenditures for the purchase of ingredients of culture media. Therefore, in manufacturing, usually for reasons of economy determine the optimal process parameters.

Established that the lowest flow rate of bacterial solution with a density of irrigation 100 g/l promotes more rapid settling of the bacteria on the ore particles, as evidenced by a more intense coloring it. The concentration of ferric iron in this case is gradually reduced and stabilized at 2.5 g/L. At high speed of the fluid the process is stable at higher concentrations of ferric iron – 6 g/l.

To select the effective density of bacterial irrigation after bioleaching carried out chemical leaching with thiosulfate in a concentration of 15 g/l for 18 days with a density of irrigation 25 l/t day. The concentration of gold in the leach solution gradually decreases, while the concentrations of arsenic after two weeks of decline begins to increase.

Thus, averaged values of gold concentrations increase with increasing intensity of bacterial irrigation, exceeding

the control options in 2.7 – 3 times, which is reflected in the increase of gold recovery into solution. Average concentrations of arsenic in experimental variants on the contrary, below the control average is 1.2-1.8 times.

УДК 622.775

НАНОМИНЕРАЛОГИЯ УРАНА

Турысбекова Г.С., Меретуков М.А., Бектай Е.К.

Казахский Национальный Исследовательский Университет им.К.И.Сатпаева, Алматы, Республика Казахстан
500010, Алматы, ул.Сатпаева 22
e-mail: ipgauhartas@gmail.com

Исследованы некоторые аспекты наноминералогии урана, проявление размерных эффектов при образовании наноминералов, в результате адсорбции, химического и биохимического восстановления, включая внеклеточное биогенное восстановление. Влияние этих процессов на интенсификацию скважинного подземного выщелачивания урана.

Ключевые слова: наноминералогия, уран, подземное выщелачивание, адсорбция, нанофазы, внеклеточное биогенное восстановление, псевдоморфозы.

Проявление размерных эффектов. Для минералов урана размерные эффекты могут проявляться как структурные (кластерные), а также в случаях, когда уран представлен наноминералами или вторичными образованиями в виде нанопленок или наночастиц в результате: а) адсорбции, б) химического или биохимического восстановления в гипергенных условиях.

Адсорбция. В природных водах результатом адсорбции растворимых соединений урана на поверхности коллоидов является образование пленок, что обусловливает увеличение концентрации урана в почвенном слое на много порядков по сравнению со значениями, полученными расчетным способом . Однако другой химический состав водной фазы может обусловить изменение термодинамических характеристик системы и оказать влияние на окисление или стабильность уранинита.

Биохимические взаимодействия и биогенные нанофазы. Биохимические взаимодействия играют ключевую роль в природных процессах, определяющих химическое состояние и мобильность соединений урана [1]. Это влияние может реализоваться или непосредственно за счет клеточного метаболизма, или косвенно – за счет изменения поверхностных свойств, редокс-обстановки и величины pH, образования лигандов или новых минералов.

Прямое влияние микроорганизмов. В геохимическом цикле урана существенную роль играют микроорганизмы, участвуя в таких процессах, как биосорбция, осаждение продуктов гидролиза, внутриклеточное осаждение, редокс-взаимодействия между U(VI) и U(IV), а также биоминерализация, продуктами которой являются наночастицы уранинита [2-4], а также наночастицы могли быть синтезированы с помощью прямого взаимодействия с бактериальными клетками, использующими энергию метаболизма при восстановлении U(VI) → U(IV) [5, 6].

Влияние биовосстановления на образование других фаз и влияние структуры клеточных стенок и механизма передачи электронов. Установлено, что в природных условиях биовосстановление U(VI) может завершаться образованием не только наночастиц уранинита, но и других твердых фаз на основе фосфатов или карбонатов урана [7].

Внеклеточное биогенное восстановление. Внеклеточное биогенное восстановление U(VI), сопровождающееся образованием нанокристаллов уранилфосфата, зафиксировано для грам-положительных бактерий Bacillus subtilis и металлвосстанавливающих бактерий Anaeromyxobacter dehalogenans, Geobacter sulfurreducens и Shewanella putrefaciens [8]. Установлено, что в данном случае биовосстановление U(VI) до наночастиц U(IV) реализуется с помощью передачи электронов от бактериальной клетки к растворенному или адсорбированному фосфатному комплексу

Твердофазные акцепторы электронов. Микробиологическое «дыхание», использующее твердофазные акцепторы электронов, отличается от дыхания, использующего такие растворимые терминальные акцепторы, как молекулярный кислород, нитрат, сульфат и др. В случае малорастворимых оксидов железа (III) некоторые железовосстанавливающие бактерии передают электроны либо за счет прямого контакта с оксидной поверхностью, либо с помощью редуктазы, расположенной на внешней мембране таких грам-отрицательных бактерий, как Geobacter и Shewanella [9], либо с помощью электропроводящих «от-

ростков» типа нанопроволок [10,11].

Конгломерат бактерий. Необычная композиция, содержащая биогенные наночастицы коффинита и пирита, ассоциированных с кальцитом и углеродом нефтяного происхождения, обнаружена в песчаниковой руде уранового месторождения Шашагетаи (Китай) [12]. В составе агрегатов пирита обнаружены нанообразования коффинита, структурно сходные с бактериями (т. е. являющиеся псевдоморфозами); их длина составляет от 300 нм до 12 мкм, а ширина – от 100 нм до 2 мкм. Другой морфологической формой является глобулярная[12].

Поглощение урана гелями. Имеются примеры поглощения урана гелями, образующимися при перколяции дренажных растворов в условиях действующего уранового завода во Франции [13]. Уран в растворе находится в виде комплексов уранила, характеризующегося наличием двух аксиальных ($U\text{-}O_{ax}$) и четырех экваториальных ($U\text{-}O_{eq}$) атомов кислорода. Образование гелей обусловлено химическим выветриванием урансодержащего гранита за счет воздействия кислых растворов.

НИЛ «БиоГеоТехнология золота, урана и полиметаллических руд» (НАО КазНИТУим.К.И.Сатпаева). При лабораторных и полупромышленных испытаниях, проведенных нами на одном из месторождений Казахстана [14], изучено влияние различных факторов на процесс подземного выщелачивания (ПВ) в присутствии бактерий. В растворах ПВ нами установлено наличие нескольких видов бактерий и их колоний. Установлены закономерности влияния бактерий на процесс скважинного подземного выщелачивания при различных температурах и технологических параметров. Предположено, что в условиях ПВ урана возможно образование его вторичных наноминералов вследствие адсорбции, биохимических взаимодействий и переосаждения, что может значительно влиять на интенсификации. процесса подземного выщелачивания урана.

Литература:
1. Markich S. // Sci. World J. 2002. V. 2. P. 707-729
2. Lloyd J., Renshaw J. // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. P. 254–260.
3. Landa E. // Microbial biogeochemistry of uranium mill tailings. Adv. Appl. Microbiol. 2005. V. 57. P. 113–130.
4. Gadd G. // Microbiology. 2010. V. 156. P. 609–643
5. Lovley D., Phillips E., Gorby Y., Landa E. // Nature. 1991. V. 350. P. 413–416
6. Suzuki Y., Banfield J. // Rev. Mineral. 1999. V. 38. P. 393–432
7. Boyanov M., Fletcher K., Kwon M. et al. // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. P. 8336–8344
8. Rui X.,Kwon M.,O'Loughlin E.et al.//Environ.Sci.Technol.2013.V.47. P.5668–5678
9. Shi L.,Richardson D.,Wang Z. et al. // Environ. Microbiol.Rep.2009.V.1. P. 220–227.
10. Gorby Y., Yanina S.,McLean J.et al.//Proc.Nat.Acad.Sci.USA.2006.V.103.P. 11358–11363.
11. Reguera G., McCarthy K., Metha T. et al. // Nature. 2005. V. 435. P. 1098–1101.
12. Cai C., Dong H., Li H. et al. // Chem. Geol. 2007. V. 236. P. 167–179
13. Allard T., Ildefonse P., Beaucaire C., Calas G. // Chem. Geol. 1999. V. 158. P.81–103.
14. Turysbekova G. Mining show. October, 2016, Dubai. Project innovation – technological advances to revolutionise mining.

UDC 622.775

NANOMINERALOGY OF URANIUM

Turysbekova G. S., Meretukov M. A., Bektay E. K.

Kazakh National Research Technical University named after Satpayev K.I., Almaty, Republic Of Kazakhstan
500010, Almaty, Satpaev street 22
e-mail: ipgauhartas@gmail.com

Investigated some aspects of nanomineralogy of uranium, the manifestation of size effects in the formation of nanominerals, as a result of adsorption, chemical and biochemical recovery, including extracellular nutrient recovery. The influence of these processes on intensification of underground leaching of uranium.

Key words: nanomineralogy, uranium, underground leaching, adsorption, nano extracellular nutrient recovery, pseudomorphs.

The manifestation of size effects. For minerals of uranium size effects can appear as structural (cluster), as well as in cases where the uranium is represented by nanomineralogy or secondary formations in the form of nanofilms or nanoparticles as a result of: a) adsorption b) chemical or biochemical recovery in supergene conditions.

Adsorption. In natural waters the result of adsorption of soluble compounds of uranium on the surface of the

colloids is the formation of films, resulting in an increase in the concentration of uranium in the soil layer is many orders of magnitude compared to the values obtained by the calculation method. However, different chemical composition of the aqueous phase may cause a change in the thermodynamic characteristics of the system and to influence the oxidation or the stability of uraninite.

Biochemical interaction and biogenic nanophases. Biochemical interactions play a key role in the natural processes that determine the chemical state and mobility of uranium compounds [1]. This effect can be realized directly or through cellular metabolism, or indirectly by changing surface properties, redox environment and pH, formation of ligands and new minerals.

The direct effect of microorganisms. In the geochemical cycle of uranium microorganisms play an important role, participating in such processes as Nov, deposition of products of hydrolysis, intracellular deposition, the redox interactions between U(VI) and U(IV), as well as biomineralisation, the products of which are nanoparticles of uraninite [2-4] and nanoparticles could be synthesized by direct interaction with bacterial cells that uses the energy of metabolism in the recovery of U(VI) → U(IV) [5, 6].

The effect of bioremediation on the formation of other phases and the effect of the structure of cell walls and the mechanism of electron transfer. It is established that under natural conditions the bioremediation of U(VI) can result in formation of not only nanoparticles of uraninite, but also by other solid phases based on phosphates or carbonates of uranium [7].

Extracellular nutrient recovery. Extracellular biogenic recovery of U(VI), accompanied by the formation of nanocrystals of uranylacetate recorded for gram-positive bacteria Bacillus subtilis and metal restoring bacteria Anaeromyxobacter dehalogenans, Geobacter sulfurreducens and Shewanella putrefaciens [8]. It is established that in this case the bioremediation of U(VI) to the nanoparticles of U(IV) is accomplished by electron transfer from bacterial cells to dissolved or adsorbed phosphate complex.

Solid-phase electron acceptors. Microbial "respiration" using solid-phase electron acceptors, different from the breathing, using of such soluble terminal acceptors like molecular oxygen, nitrate, sulfate, etc. In the case of low-soluble iron (III) oxide some iron reducing bacteria transfer electrons either through direct contact with an oxide surface, either via reductase located in the outer membrane of gram-negative bacteria like Geobacter and Shewanella [9], or by using a conductive «processes» like nanowires [10,11].

Conglomerate of bacteria. An unusual composition, containing biogenic nanoparticles of coffinite and pyrite associated with calcite and carbon of petroleum origin, discovered in the Sandstone uranium ore deposits Sasagete (China) [12]. In the composition of aggregates of pyrite discovered nano formation of coffinite structurally resemble to bacteria (i.e. pseudomorphs); their length is from 300 nm to 12 microns and a width from 100 nm to 2 μm. Another morphological form is globular [12].

The absorption of uranium by gel. There are examples of the absorption of uranium by gels formed when percolation of drainage solutions in terms of the current uranium plant in France [13]. Uranium in solution is in the form of complexes of uranyl, characterized by the presence of two axial (U-Oax) and four Equatorial (U-Oeq) oxygen atoms. The formation of gels due to the chemical weathering of uranium-bearing granite due to exposure to acidic solutions.

Research laboratory «BioGeoTechnology of gold, uranium and polymetallic ores» (KazNRTU named after K.I.Satpayev). In laboratory and pilot plant tests that we conducted on one of the fields of Kazakhstan [14], investigated the influence of various factors on the process of underground leaching (ISL) in the presence of bacteria. In solutions of PV, we have established the presence of several types of bacteria and their colonies. Determined the regularities of the influence of bacteria on the process of underground leaching at different temperatures and process parameters. It was supposed that in terms of PV of uranium, there can be the formation of its secondary nanominerals due to adsorption, biochemical interactions and perioadele that can have a significant impact on intensification of the process of underground leaching of uranium.

References:

1. Markich S. // Sci. World J. 2002. V. 2. P. 707-729
2. Lloyd J., Renshaw J. // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. P. 254–260.
3. Landa E. // Microbial biogeochemistry of uranium mill tailings. Adv. Appl. Microbiol. 2005. V. 57. P. 113–130.
4. Gadd G. // Microbiology. 2010. V. 156. P. 609–643
5. Lovley D., Phillips E., Gorby Y., Landa E. // Nature. 1991. V. 350. P. 413–416
6. Suzuki Y., Banfield J. // Rev. Mineral. 1999. V. 38. P. 393–432
7. Boyanov M., Fletcher K., Kwon M. et al. // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. P. 8336–8344
8. Rui X.,Kwon M.,O'Loughlin E.et al.//Environ.Sci.Technol.2013.V.47. P.5668–5678
9. Shi L.,Richardson D.,Wang Z. et al. // Environ. Microbiol.Rep.2009.V.1. P. 220–227.
10. Gorby Y., Yanina S.,McLean J.et al.//Proc.Nat.Acad.Sci.USA.2006.V.103.P. 11358–11363.
11. Reguera G., McCarthy K., Metha T. et al. // Nature. 2005. V. 435. P. 1098–1101.

12. Cai C., Dong H., Li H. et al. // Chem. Geol. 2007. V. 236. P. 167–179
13. Allard T., Ildefonse P., Beaucaire C., Calas G. // Chem. Geol. 1999. V. 158. P.81–103.
14. Turysbekova G. Mining show. October, 2016, Dubai. Project innovation – technological advances to revolutionise mining.

УДК 579.22

О МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦИИ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ У АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФОВ

Панюшкина А.Е.[1], Кострюкова Е.С.[2], Матюшкина Д.С.[2], Побегуц О.В.[2], Летаров А.В[1].

[1]Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агенства, Москва, Россия
e-mail: zhuravleva-inmi@mail.ru

Обсуждаются механизмы адаптации к ионам тяжелых металлов в среде у ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов и роль шаперонов в клеточном ответе.

Ключевые слова: ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы; металлорезистентность; геном; протеомика; шапероны.

Сообщества ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов (АХМ), обнаруживаемые в природных и техногенных местообитаниях, представляют большой интерес для прикладной науки благодаря уникальному свойству использовать железо и серосодержащие субстраты в своем энергетическом метаболизме. Окисление Fe^{2+}, S0, S^{2-} и сульфидов металлов позволяет использовать сообщества АХМ для извлечения благородных и цветных металлов из сульфидного сырья в процессе чанового и кучного биовыщелачивания. Из-за специфики местообитаний с чрезвычайно низкими значениями pH – до 1-2 ед – АХМ адаптированы к различным экстремальным факторам, включая резистентность к металлам. Многие представители ацидофильных хемолитотрофов толерантны к экстремально высокому содержанию тяжелых металлов, токсичных для других микроорганизмов в значительно меньших концентрациях – на 1-2 порядка. Данная характеристика важна для промышленных процессов, поскольку микробная стадия окисления требует участия сообществ АХМ, обладающих экстремальной металлорезистентностью. Несмотря на это, механизмы подобной устойчивости не до конца выяснены. Данные, полученные нами и другими исследователями, показывают, что механизмы металлорезистентности АХМ различаются в зависимости от конкретного организма, ключевую роль в которых могут играть системы защиты, включающие шапероны, шаперонины и белки стресса.

ADAPTIVE MECHANISMS TO HEAVY METALS IN ACIDOPHILIC CHEMOLITHOTROPHS

Panyushkina A.E.[1], Kostryukova E.S.[2], Matyushkina D.S.[2], Pobeguts O.V.[2], Letarov A.V[1].

[1]Winogradsky Institute of Microbiology, The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[2]Federal Medical and Biological Agency SRI of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia
e-mail: zhuravleva-inmi@mail.ru

The mechanisms of adaptation of acidophilic chemolithotrophic microorganisms to heavy metal ions in the medium together with the role of chaperones in the cell response are discussed.
Key words: acidophilic chemolithotrophic microorganisms; metal resistance; genome; proteomics; chaperones.

Communities of acidophilic chemolithotrophic microorganisms (ACM) found in natural and man-caused habitats are of great interest for applied science due to their unique property to utilize mineral Fe and S substrates in energy metabolism. Fe^{2+}, S0, S^{2-} and metal sulfide oxidation allows using ACM communities for noble and non-ferrous metal recovery from sulfide raw materials in the process of tank and heap bioleaching. Because of

the specificity of habitats, ACM are adapted to different extreme factors, including heavy metals of extremely high concentrations in the environments with very low pH values (to 1–2). Many representatives of acidophilic chemolithotrophs are adapted to extremely high heavy metal content toxic for other microorganisms in far less concentrations – 1–2-fold. This characteristic is important for industrial processes, because microbial stage of oxidation requires ACM communities possessing extreme metal tolerance. Nevertheless, the mechanisms of such resistance are still not evident.

The data obtained in the present work together with the studies conducted by other investigators reveal that the mechanisms of metal resistance in ACM vary depending on a particular organism and can also involve defense systems including chaperones, chaperonins and stress proteins and which can play key roles in them.

УДК 579.66

ДВУХСТАДИАЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС БИООКИСЛЕНИЯ ЗОЛОТОМЫШЬЯКОВИСТЫХ КОНЦЕНТРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОФИЛЬНОЙ АССОЦИАЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Белый А.В., Солопова Н.В., Малашонок А.П., Телеутов А.Н., Секачев В.С., Ревенко А.А., Красильников Г.С.

Исследовательский центр АО «Полюс
660061, Россия, Красноярск, ул. Цимлянская, 37
e-mail: BelyiAV@polyusgold.com

Разработана технология переработки флотоконцентратов золотомышьяковистых руд с высоким содержанием пирротина, позволяющая снизить содержание сульфидной и элементной серы в кеке биоокисления

Ключевые слова: нейтрофильная ассоциация хемолитоавтотрофных микроорганизмов, биоокисление, биокек, сульфидные минералы, элементная сера

В настоящее время в технологическом процессе чанового выщелачивания упорных золотосодержащих арсенопирит-пиритных руд и концентратов в основном используются мезофильные бактерии Acidithiobacillus ferrooxidans, Acidithiobacillus thiooxidans, Leptospirillum ferrooxidans и их ассоциации. Однако процесс окисления сульфидных минералов является экзотермическим и температура в биореакторе может повышаться до температур, превышающих верхний предел для роста мезофильных бактерий.

Высокотемпературные ассоциации микроорганизмов в биогидрометаллургических технологиях могут применяться как, самостоятельно (температура постоянна на протяжении всех ступеней биоокисления), так с комбинацией различных температурных режимов – повышения температуры в головных реакторах или в реакторах вторичной ступени биоокисления. Успешным является применение высокотемпературных ассоциаций для доокисления биокека продуктов обогащения Олимпиадинского месторождения.

Использование высокотемпературных ассоциаций микроорганизмов в биогидрометаллургических технологиях дает ряд преимуществ по сравнению с мезофильными и умеренно термофильными ассоциациями: более полное окисление сульфидов, улучшение качество биокека и снижение расхода цианистого натрия при последующем извлечении золота.

Рабочая ассоциация получена на основе аборигенных микроорганизмов, адаптированных к окислению элементной серы в биокеке флотоконцентрата руд Олимпиадинского месторождения при 50 0С. В формировании структуры рабочей высокотемпературной ассоциации использовалась спонтанная микрофлора месторождения. Доминантным видом были бактерии Thermithiobacillus tepidarius. Определена плотность пульпы при которой окисление сульфидной серы в биокеке наиболее эффективно (62-83%) при этом степень извлечения золота на уровне 94-96%, а расход цианистого натрия снижается на 75-78%. Выделенная высокотемпературная ассоциация применена в технологической схеме биоокисления с непрерывной подачей питания.

Данное направление является перспективным в плане практического применения на производственных участках ОЗИФ.

УДК 579.66

TWO STAGE PROCESS OF GOLD-ARSENIC CONCENTRATES BIOOXIDATION USING THERMOPHILIC ASSOCIATION OF NEUTROPHILIC MOCROORGANISMS

A. Belyi, N. Solopova, A. Malashonok, A. Teleutov, V. Sekachev, A. Revenko, G. Krasilnikov.

JSC "Polyus" Research Center
37, Tsymlyanskaya str., Krasnoyarsk, Russia, 660061
e-mail: BelyiAV@polyusgold.com

Technology of gold-arsenic ores concentrates with high pyrrhotite grade has been developed. It allows reducing the content of elemental sulfur and sulphide sulphur in biooxidation cake.

Key words: neutrophilic association of chemolithotrophic organisms, biooxidation, biocake, sulfide minerals, elemental sulfur.

Nowadays in refractory gold-containing arsenopyrite-pyrite ores and concentrates tank leaching technological process mainly used mesophilic bacteria, such as Acidithiobacillus ferrooxidans, Acidithiobacillus thiooxidans, Leptospirillum ferrooxidans and its associations. However, sulphidic minerals oxidation process is exothermal process and the temperature in bioreactor can reach temperatures exceeding the upper limit for mesophilic bacteria growth.

High-temperature microorganisms associations in biohydrometallurgical technologies can be used independently (the temperature is permanent during all biooxidation stages), as well as with combination of different thermal modes – temperature increase in main reactor or in second stage biooxidation reactors. Usage of high temperature associations for Olimpiada deposit biokek beneficiation products oxidation is successful.

Usage of high temperature microorganisms associations in biohydrometallurgical technologies has several advantages in comparison with mesophilic and medium thermophilic associations: more completed oxidation of the sulfides, biokek quality improvement, reduction of the sodium cyanide consumption in the subsequent gold extraction.

This association is based on native organisms adapted for elemental sulphur oxidation in Olimpiada ores flotation concentrate biokek at a temperature of 50 0C. In working high-temperature association structure formation was used a spontaneous microbial flora of the deposit. The dominant species was bacteria Thermithiobacillus tepidarius. Pulp density for the most effective oxidation (62-83%) of sulphide sulphur in biocake was determined. In this case gold extraction is about 94-96%, and sodium cyanide consumption is reduced by 75-78%. This high-temperature association is used in biooxidation with constant feeding technological scheme.

This direction is promising in terms of practical application in the production areas of Olimpiada gold-processing plants.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 66.061.34+579.66

ОКИСЛЕНИЕ ПИРИТА УМЕРЕННО-ТЕРМОФИЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Лабырич М.В.[1,2], Булаев А.Г.[1,3]

[1]Институт 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
[2]Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия,
127550, Москва, ул. Тимирязевская , 49
[3]Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия,
119234 Москва, Ленинские горы, д. 1
e-mail: labyrich.marya@yandex.ru, bulaev.inmi@yandex.ru

Представлены данные о скорости окисления пирита различными микроорганизмами – представителями групп, доминирующих в промышленных процессах биоокисления. Показано, что скорости окисления минерала разными микроорганизмами различались, что может быть обусловлено различиями их физиологических свойств.

Ключевые слова: биогидрометаллургия; ацидофильные микроорганизмы; сульфидные минералы, пирит.

В настоящее время для добычи цветных и благородных металлов из сульфидных руд и концентратов активно применяются биогидрометаллургические технологии, основанные на процессах окисления сульфидных минералов ацидофильными микроорганизмами, использующими в качестве энергетического субстрата двухвалентное железо и серу. Механизмы взаимодействия микроорганизмов и сульфидных минералов достаточно хорошо изучены. Кристаллическая решетка самого распространённого сульфидного минерала, пирита, разрушается посредством тиосульфатного механизма: тиосульфат здесь является главным интермедиатом, окисляющимся до сульфата, а сера – побочным продуктом. В случае тиосульфатного механизма окислителем является только ион Fe3+, поэтому осуществляется этот процесс микроорганимзмами, способными окислять Fe2+. Целью данной работы является сравнение скорости окисления пирита различными микроорганизмами – представителями групп, доминирующих в промышленных процессах биоокисления. Опыты проводили в колбах со 100 мл среды, содержащей минеральные соли и 0,01% ДЭ, и 2 г. пирита при 45°С на ротационной качалке (200 об./мин). Продолжительность опыта составила 30 сут., каждые 5 сут. отбирали пробы жидкой фазы. В отобранных пробах фиксировали окислительно-восстановительный потенциал (Eh), pH среды и концентрацию железа в жидкой фазе, т.к. эти параметры позволяют судить об окислительной активности микроорганизмов. В экспериментах были использованы штаммы Acidithiobacillus caldus MBC-1, Sulfobacillus thermosulfidooxidans VKMV 1269T и Acidiplasma sp. MBA-1. Микроорганизмы инокулировали таким образом, чтобы начальная численность клеток составляла 1×107 кл/мл. Для эксперимента использовали различные сочетания штаммов: Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T, Acidiplasma sp. MBA-1, A. caldus MBC-1, Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T + A. caldus MBC-1, Acidiplasma sp. MBA-1 + A. caldus MBC-1, Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T + Acidiplasma sp. MBA-1. Суммарные концентрации железа в среде были наибольшим в вариантах «Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T + A. caldus MBC-1», «Acidiplasma sp. MBA-1 + A. caldus MBC-1» и «Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T + Acidiplasma sp. MBA-1» и достигали 3,8, 3,5 и 3,3 г/л, соответственно. В этих вариантах опыта практически все железо было представлено ионами Fe3+, что подтверждалось высокими значениями Eh среды. Концентрация ионов железа в стерильном контроле, а также в вариантах с чистыми культурами Acidiplasma sp. MBA-1 и A. caldus MBC-1 оставалась низкой. Это свидетельствует о том, что в данных вариантах пирит практически не окислялся. В варианте с чистой культурой Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T в первые 10-х сут. окисление происходило достаточно быстро, но после 10 сут. окислительная активность бактерий в данном варианте резко снизалась: концентрация трехвалентного железа, достигнув пика (1,8 г/л), начала снижаться, а двухвалентного железа – расти. Выявленные различия скорости окисления пирита могут объясняться различиями физиологических свойств микроорганизмов. A. caldus способен окислять только серу, поэтому не способен окислять пирит в чистой культуре, так как это требует генерации окислителя – ионов Fe3+. Однако данный микроорганизм играет определенную роль в окислении пирита, так как в его присутствии и Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T, и Acidiplasma sp. MBA-1 окисляли пирит значительно быстрее, чем в чистой культуре. Это может быть обусловлено двумя факторами. Во-первых, A.caldus активнее окисляет серу по сравнению с Sb. thermosulfidooxidans и Acidiplasma sp. MBA-1 и может удалять с поверхности пирита осадки элементарной серы, которая образуется в процессе окисления и блокирует доступ окислителя Fe3+ к поверхности минерала. Во-вторых, A.caldus является автотрофом, и его метаболиты могут использоваться Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T и Acidiplasma sp. MBA-1 в качестве источника углерода, что, в свою очередь, увеличивает их активность. Результаты данной работы приводят к выводу о том, что разные группы микроорганизмов вносят различный вклад в окисление пирита в процессах биоокисления.

OXIDATION OF PYRITE BY MODERATELY THERMOPHILIC MICROORGANISMS

Labyrich M.V.[1,2], Bulaev A.G.[1,3]

[1]Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071 Moscow, 33, bld. 2 Leninsky Ave

[2]Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia
127550 Moscow, 49, Timiryazev street
[3]Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia
119071 Moscow, 1, bld. 12 Leninskiye Gory
e-mail: labyrich.marya@yandex.ru, bulaev.inmi@yandex.ru

The data on pyrite oxidation by different microorganisms, representatives of the groups predominating in industrial bioleaching processes, are demonstrated. It was shown that rates of mineral oxidation by microorganisms varied that can be caused by differences in physiological properties.

Key words: biohydrometallurgy, acidophilic microorganisms, sulfide minerals, pyrite.

Currently biohydrometallurgical technologies based on oxidation of sulfide minerals by acidophilic microorganisms consuming ferrous iron and sulfur as energetic substrates are widely used to extract non-ferrous and noble metals from sulfide ores and concentrates. Mechanisms of interaction between microorganisms and sulfide minerals have been well studied. Crystal lattice of the most abundant sulfide mineral, pyrite, is destructed through thiosulfate mechanisms, i.e., main intermediate is thiosulfate oxidized to sulfate, whereas sulfur is by-product. In the case of thiosulfate mechanism, only Fe3+ ion is oxidizing agent, therefore this process can be performed by Fe^{2+}-oxidizing microorganisms. The goal of the present work was to compare rates of pyrite oxidation by different microorganisms, representatives of the groups predominating in industrial bioleaching processes. The experiments were performed in flasks with 100 mL of the medium containing mineral salts and 0.01% of YE and 2 g of pyrite at 45°C on rotation shaker (200 rpm). The duration of the experiment was 30 d and samples of the liquid phase were collected every 5 days. Redox potential (Eh), pH, and iron concentrations were measured in the samples because these parameters reflect oxidative activity of microorganisms. Strains Acidithiobacillus caldus MBC-1, Sulfobacillus thermosulfidooxidans VKMV 1269T, and Acidiplasma sp. MBA-1 were used in the experiments. Microorganisms were inoculated in the medium in such a way that initial cell number was 1 × 107 cells/mL. The following combinations of the strains were used in the experiments: Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T, Acidiplasma sp. MBA-1, A. caldus MBC-1, Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T + A. caldus MBC-1, Acidiplasma sp. MBA-1 + A. caldus MBC-1, Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T + Acidiplasma sp. MBA-1. Iron concentrations in the medium were the highest in the variants "Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T + A. caldus MBC-1", "Acidiplasma sp. MBA-1 + A. caldus MBC-1", and "Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T + Acidiplasma sp. MBA-1" and achieved 3.8, 3.5, and 3.3 g/L, respectively. In these variants, iron in the solution was almost completely presented by Fe3+ ions that was confirmed by high values of redox potential. Iron concentration in sterile control as well as in variants "Acidiplasma sp. MBA-1" and "A. caldus MBC-1" were very low. It demonstrated that in these variants pyrite almost did not oxidize. In the variant "Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T", rate of oxidation was high during 10 d of the experiment but then oxidation activity drastically decreased. Ferric iron concentration achieved maximum (1.8 g/L) and then decreased, whereas ferrous iron concentration began to increase. Revealed differences in pyrite oxidation rate can be explained by the differences in physiological properties between microorganisms. A. caldus is able to oxidize only sulfur therefore pure culture of this bacterium is not able to oxidize pyrite since it cannot generate oxidizing agent (ferric iron ions). Nevertheless, this microorganism can play certain role in pyrite oxidation since in its presence both Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T and Acidiplasma sp. MBA-1 oxidized pyrite more actively than in pure culture. It can be caused by two factors. First, A.caldus is able to oxidize sulfur more actively than Sb. thermosulfidooxidans and Acidiplasma sp. MBA-1 and remove elemental sulfur, which is formed during oxidation and prevent contact of Fe3+ ions and mineral surfaces, from pyrite surface. Second, A.caldus is autotroph and its metabolites can be consumed by Sb. thermosulfidooxidans VKMV 1269T and Acidiplasma sp. MBA-1 as carbon source that in turn can increase their activity. Results of the present work suggest that different groups of microorganisms have different impact in pyrite biooxidation.

ДК 559:550.72

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ МАРГАНЦЕВЫХ РУД РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

Ташканбаев О.Н., Исламов Б.Ф., Сомова У.А.

Государственное предприятие «Научно-исследовательский институт минеральных ресурсов», Ташкент, Республика Узбекистан
100060, Ташкент, ул. Т. Шевченко, дом 11 а
e-mail: Oybek.tashkanbaev@mail.ru

Из марганцевых руд месторождений Узбекистана были выделены различные ассоциации автотрофных гетеротрофных микроорганизмов, которые были использованы для кислотного и щелочного биовыщелачивания марганца. Показано, извлечение марганца биовыщелачиванием зависит от химического состава марганцевых руд.

Ключевые слова: марганецсодержащие руды, автотрофные бактерии, гетеротрофные бактерии, биовыщелачивание.

Марганец является одним из промышленно-важных элементов, который широко используется для получения ферромарганца и легирования стали. При переработке марганцевых руд микроорганизмы могут быть использованы для восстановления Mn^{4+} в Mn^{+2} и выщелачиване его, для растворения карбонатов, а также для снижения содержания кремния и фосфора, что в значительной степени повышает качество руд.

На территории Узбекистана имеются два крупных месторождения – Дауташ и Тахтакарача, руды которых рассматриваются как сырье для получения марганцевых концентратов. Проведенные исследования показали, что механические способы обогащения, такие как гравитация и магнитная сепарация, оказались неэффективными в получении марганцевых концентратов.

В связи с этим, были начаты исследования по разработке технологии переработки марганцевых руд с использованием методов биотехнологии. Из марганцевых руд месторождений Дауташ и Тахтакарача были выделены ацидофильные ассоциации автотрофных бактерий и ассоциации гетеротрофных микроорганизмов, которые были использованы для кислотного и щелочного биовыщелачивания марганца. В результате проведенных исследований показано, что ацидофильная ассоциация автотрофных бактерий АТ-2 выщелачивала марганец из руд месторождения Тахтакарача от 63,5 до 78,9%, в то время как ассоциация гетеротрофных бактерий ГТ-1 – от 10,2 до 25,1%. Извлечение марганца из руд месторождения Дауташ составляло: ацидофильной ассоциацией автотрофных бактерий АД-1 от 44,2 до 57,4%, а ассоциацией гетеротрофных бактерий ГД-3 – от 44,1 до 55,1%. Следует отметить, что гетеротрофные микроорганизмы выделяли из марганцевых руд на среде МПБ, а выращивание бактерий для биовыщелачивания марганца проводили на средах, в составе которых в качестве органических веществ использовали различные растительные отходы.

Таким образом, на основании полученных результатов исследований можно полагать, что биовыщелачивание марганца из руд месторождений Тахтакарача и Дауташ зависит от вещественного состава руд и может быть перспективным и эффективным для переработки бедных руд.

DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGY PROCESSING OF MANGANESE ORE REPUBLIC OF UZBEKISTAN

O.N. Tashkanbaev., B.F. Islamov, U.A. Somova

Tashkent,
State Enterprise «Scientific Research Institute of Mineral Resources», Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100060
T.Shevchenko Str., 11/A
e-mail: Oybek.tashkanbaev@mail.ru

From manganese ore deposits of Uzbekistan were allocated various associations autotrophic heterotrophic microorganisms that have been used for acid and alkaline manganese bioleaching. Shown bioleaching manganese extraction depends on the chemical composition of the manganese ore.

Key words: manganese ore, autotrophic bacteria, heterotrophic bacteria, bioleaching.

Manganese is one of the industrially-important elements, which is widely used to produce ferromanganese and steel alloying. When manganese ore processing microorganisms can be used to restore a Mn^{4+} Mn^{+2} and leaching it to dissolve the carbonates, and also to reduce the content of silicon and phosphorus, which greatly improves the quality ores.

On the territory of Uzbekistan are two major fields – Dautash and Tahtakaracha , which ores are considered as a raw material for manganese concentrates.

Studies have shown that mechanical methods of enrichment, such as gravity and magnetic separation, proved ineffective in obtaining manganese concentrates.

Therefore, studies have been initiated on developing the technology of reprocessing manganese ores, using biotechnology method

Acidophilus associations of autotrophic bacteria and heterotrophic microorganisms were allocated from the manganese ore deposits Dautash and Tahtakaracha, which have been used for acid and alkaline manganese bioleaching.

The studies demonstrated that association of acidophilic autotrophic bacteria AT-2 leached manganese ores from Tahtakaracha from 63.5 to 78.9%, while the association of heterotrophic bacteria GT-1 from 10.2 to 25.1%.

Extraction of manganese from ores Dautash deposit was: association acidophilic autotrophic bacteria AD-1 from 44.2 to 57.4%, and the association of heterotrophic bacteria GD-3 from 44.1 to 44.1 to 55.1. It should be noted that heterotrophic microorganisms isolated from manganese ores in the MPB environment, while cultivation for bioleaching bacteria manganese conducted on environments which include those as organic substances used various vegetable waste.

Thus, on the basis of these research results, it can be assumed that bioleaching of ores of manganese and Tahtakaracha and Dautash depends on the material composition of the ores may be a promising and effective for processing of low-grade ores.

.....

УДК: 622,7:622.342.1

РАЗРАБОТА ДВУХСТАДИАЛЬНОЙ СХЕМЫ КУЧНОГО БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ ЗОЛОТОСУЛЬФИДНЫХ РУД МЕСТОРОЖДЕНИЯ КОКПАТАС

Н.А. Магбулова[1], З.В. Калиниченко[2], О.Н. Ташканбаев[2], М.Г. Сагдиева[2]

[1]Национальный университет Узбекистана имени М. Улугбека, Ташкент, 100174, Вузгородок
[2]Государственное предприятие «Научно-исследовательский институт минеральных ресурсов», Ташкент, Республика Узбекистан 100060, Ташкент, ул. Т. Шевченко, дом 11 а
e-mail: magbulova@mail.ru

На основе полученных экспериментальных данных предлагается двухстадиальная схема кучного выщелачивания золотосульфидной руды месторождения Кокпатас, включающая обработку руды ассоциацией гетеротрофных бактерий, закисление руды и биоокисление ацидофильной ассоциацией железо- и серокисляющих бактерий.

Ключевые слова: гетеротрофные бактерии, черносланцевая часть, сульфидные руды, двойная упорность, хемолитоавтотрофы, кучное биовыщелачивание.

В последнее время особое внимание уделяется биотехнологии переработки золотосульфидных руд и концентратов, обладающих двойной упорностью – тонко вкрапленным золотом в сульфидных минералах и наличием природного сорбционно-активного органического углерода. К таким рудам относятся и руды золотосульфидных месторождений Кокпатас и Даугызтау, которые с 2008 года перерабатываются на Гидрометаллургическом заводе 3 (ГМЗ-3) Навоийского горно-металлургического комбината (город Учкудук). Анализ технологического процесса биоокисления флотоконцентратов, полученных из руд месторождений Кокпатас и Даугызтау, показывает, что наличие от 5,0 до 10% углистых веществ оказывает негативное влияние не только на процесс сорбционного цианирования, но и на технологический процесс биоокисления.

В связи с этим, была изучена микрофлора черносланцевой части сульфидных руд месторождений Кокпатас и Даугызтау. Показано, что в микрофлоре доминирующее место занимают гетеротрофные бактерии, при этом экспериментально установлено, что микрофлора руд месторождения Кокпатас более разнообразна, чем микрофлора месторождения Даугызтау. Химический состав черносланцевой части руд свидетельствует о наличие в рудах большого количества углерода.

Наиболее распространенными среди гетеротрофной микрофлоры можно считать Bacillus sp.1 и Rhodococcus sp.2. Обе эти культуры выделены на среде МПБ и были адаптированы к черносланцевой составляющей сульфидных руд месторождения Кокпатас.

Для культивирования штаммов Bacillus sp.1 и Rhodococcus sp.2) использовали минеральную среду, разработанную нами следующего состава (г,л): $MgSO_4$ – 0,5; NaCl – 0,5; $CaCO_3$ – 0,5; $FeSO_4$ – следы; аммофос – 0,5,0. В данную среду добавляли барду – отход спиртового производства, в количестве 10, 15 и 20 г/л. В результате проведенных экспериментов, было показано, что титр клеток на минеральной среде с

добавлением 15г/л барды практически мало отличается от численности на МПБ, что свидетельствует о возможной замены дорогостоящей среды МПБ на новую минеральную среду с добавлением барды.

После бактериальной обработки черносланцевой составляющей гетеротрофными бактериями биокеки отмывали дистиллированной водой, высушивали и подвергали биоокислению ацидофильной ассоциацией железо-серуокисляющих бактерий. Культивирование ассоциации проводили на термостатированной качалке при температуре 300С при 200 об/мин. В качестве контроля использовали исходную черносланцевую составляющую.

После обработки черносланцевой составляющей гетеротрофными бактериями окисление сульфидных минералов ацидофильной ассоциацией железо- серуокисляющих бактерий происходит намного активнее по сравнению с контролем – исходной рудой. Полученные данные свидетельствуют о разрушении металлорганического комплекса черносланцевой составляющей сульфидных руд месторождения Кокпатас На основании полученных данных была разработана двухстадиальная технологическая схема переработки черносланцевой части сульфидных руд месторождения Кокпатас, которая может быть использована при кучном выщелачивании сульфидных руд с высоким содержанием углистой части.

DEVELOPMENT TWO-STAGE SCHEMES OF BIOLOGICAL HEAP-LEACHING GOLD-ORE DEPOSITS OF KOKPATAS

[1]Magbulova N.A. [2]Kalinichenko Z.V., [2]Tashkanbaev O.N., [2]Sagdieva M.G.

[1]Tashkent 100174, National University of Uzbekistan by M.Ulugbek. Vuzgorodok
[2]State Enterprise «Scientific Research Institute of Mineral Resources»,
Tashkent, Republic of Uzbekistan
T.Shevchenko Str., 11/A Tashkent, 100060
e-mail: magbulova@mail.ru

On the basis of experimental data it proposed two-stage scheme of heap leach gold-ore deposits Kokpatas including ore processing association of heterotrophic bacteria, acidification of ore and bio-oxidation of acidophilic association iron and sulfur oxidation bacteria.

Key words: heterotrophic bacteria, black shale part, sulfide ores, double harder hemolitoavtotrofy, heap bioleaching.

In recent years, special attention is paid to biotechnology and processing of gold-sulfide ore concentrates having a double thrust – subtly interspersed with gold in sulfide minerals and the presence of natural sorption-active organic carbon. These ores include gold-ore deposits of Kokpatas and Daugyztau, which since 2008 are processed on the Hydrometallurgical Plant 3 (GMZ-3) of the Navoi Mining and Metallurgical Combine (Uchkuduk city). Analysis of the bio-oxidation process flotation concentrate produced from ore deposits Kokpatas and Daugyztau, shows that the presence of 5.0 to 10% carbonaceous materials have a negative impact not only on the process of sorption cyanidation, but also on bio-oxidation process.

In this regard, it has been studied microflora of the black shale deposits of sulfide ores Kokpatas and Daugyztau. It is shown that the micro flora of a dominant position occupied by heterotrophic bacteria, thus experimentally found that micro flora Kokpatas ores is more diverse than the flora Daugyztau field. The chemical composition of black shale ore portion indicates the presence of a large amount of carbon ores.

The most common among the heterotrophic micro flora can be considered Bacillus sp.1 and Rhodococcus sp.2. Both of these cultures are allocated to the BCH and the environment has been adapted to the black shale component of sulfide ore deposits Kokpatas.

For cultivation of Bacillus sp.1 and Rhodococcus sp.2 strains) using mineral medium, developed by us with the following composition (g, l): $MgSO_4$ – 0,5; NaCl – 0,5; $CaCO_3$ – 0.5; $FeSO_4$ – marks; ammophos – 0,5,0. In this environment the bard added – withdrawal of alcohol production in the amount of 10, 15 and 20 g / l. As a result of experiments, it was shown that the titer of cells on mineral medium supplemented with 15g / l vinasse virtually little different from the number on the BCH, which indicates possible replacement of costly medium with a new BCH mineral medium supplemented with stillage.

After treatment of the bacterial component of heterotrophic bacteria black shale biokeki washed with distilled water, dried and subjected bio oxidation association acidophilic bacteria sulfur oxidation iron. Cultivation was carried out on associations shaker thermostated at 300C at 200 rev / min. As a control, the

original black shale component. After processing the black shale component of heterotrophic bacteria oxidation of sulfide minerals iron sulfur oxidation. Association acidophilus bacteria is much more active than the control – the original ore. The findings suggest that the destruction of the organometallic complex component of the black shale deposits of sulfide ores Kokpatas Based on these data was developed two-stage technological scheme of black shale of the sulfide ores Kokpatas field that can be used in heap leaching of sulfide ores with a high content of carbonaceous pieces.

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 579

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА У ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА SULFOBACILLUS, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ИХ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ В ПРИРОДНЫХ И ТЕХНОГЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Панюшкина А.Е., Меламуд В.С., Цаплина И.А.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
e-mail: tsaplina_inmi@mail.ru

Обобщены результаты изучения метаболизма и анаболизма представителей бактерий рода Sulfobacillus, обеспечивающие им устойчивое сохранение в составе ацидотермофильных сообществ, окисляющих сульфидсодержащие руды; местообитание, разнообразие условий, пластичность миксотрофного метаболизма.

Термоацидофильные аэробные бактерии рода Sulfobacillus являются неотъемлемыми членами микробных сообществ, участвующих в биотехнологических процессах выщелачивания сульфидных руд, активно окисляя Fe^{2+} и восстановленные серные соединения – S0, $S_2O_3^{2-}$, $S4O_6^{2-}$, MeS. [Кондратьева и др., 2015]. Обитая в местах разрабатываемых месторождений руд, в очагах термогенеза, в условиях биовыщелачивания руд и концентратов, сульфобациллы подвергаются стрессовым воздействиям разного происхождения: смене источников питания (неорганических на органические), колебаниям pH и температуры, концентрации кислорода в среде, растворимость которого снижается с повышением температуры в кислых средах, обогащенных ионами металлов, в том числе токсичных. Их рост и развитие в подобных разнообразных условиях обеспечивает чрезвычайно пластичный миксотрофный тип метаболизма, благодаря широкому спектру ферментов углеродного обмена, выработанного в процессе эволюции. В аэробных условиях при недостатке минеральных источников энергии и CO_2 бактерии могут быстро перестраивать свой обмен, переходя на потребление имеющихся в среде небольших количеств органических соединений (0.01-0.05%). Сульфобациллы способны и к росту в условиях гипоксии (0.07% кислорода в газовой фазе), при этом процессы окисления субстратов сопряжены с восстановлением железа в качестве конечного акцептора электронов. Таким образом, в экстремальных и постоянно меняющихся условиях в процессе эволюции у сульфобацилл появился сложный геном с ферментативным аппаратом, обеспечивающим им более широкие, чем у облигатных хемолитотрофов, метаболические возможности в разных условиях биотехнологического процесса. Одновременно было установлено и отсутствие некоторых ключевых ферментов, например, изоцитрат-лиазы глиоксилатного цикла у термотолерантной культуры S. thermotolerans (ТОПТ.40-42^{o}C), умеренно-термофильных S. thermosulfidooxidans и S. sibiricus (ТОПТ.50-55^{o}C), что не позволяло бактериям в достаточной мере иметь в клетках чрезвычайно важные метаболиты-предшественники для биосинтетических процессов – сукцинат и пируват. В связи с этим в клетках сульфобацилл получил развитие анаплеротический цикл – метил-цитратный цикл (МЦЦ) пропионатного метаболизма. В настоящее время имеются (получены) молекулярно-генетические сведения о присутствии в клетках сульфобацилл (S. thermosulfidooxidans?) генов prpC, prpD и prpB, кодирующих ферменты МЦЦ с уникальной субстратной специфичностью – соответственно: метил-цитратсинтазы (MCS), метил-цитрат-дегидратазы (MCD) и метил-изоцитрат-лиазы (MCL). Функционирование цикла подтверждено рядом этапов превращения пропионил-КоА, образующегося при β-окислении жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, и метаболизирующегося в МЦЦ. Наиболее высокой активностью ферментов из трех изученных культур обладает термотолерантная бактерия S. thermotolerans, в связи с понижением токсичности пропионата со снижением температуры. Конверсия пропионил-КоА в пируват и далее в фосфоенолпируват дает возможность сульфобациллам использовать их для глюконеогенеза.

Литература:
Кондратьева Т.Ф., Булаев А.Г., Муравьев М.И. Микроорганизмы в биогеотехнологиях переработки сульфидных руд / Под ред. В. Ф. Гальченко. Москва: Наука, 2015. 212 с.

CHARACTERISTICS OF METABOLISM IN CHEMOLITHOTRIOPHIC BACTERIA OF THE GENUS SULFOBACILLUS ENABLING THEIR VITAL FUCTIONS IN NATURAL AND MAN-CAUSED ENVIRONMENTS

Panyushkina A.E., Melamud V.S., Tsaplina I.A.

Winogradsky Institute of Microbiology, The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: tsaplina_inmi@mail.ru

The results on the study of metabolism and anabolism of the representatives of the bacteria of the genus Sulfobacillus providing for their stable maintenance as members of the acidothermophilic communities oxidizing sulfide-containing ores are summarized; habitats, condition diversity, flexibility of mixotrophic metabolism.

Thermoacidophilic aerobic bacteria of the genus Sulfobacillus are essential members of microbial communities participating in biotechnological processes of leaching of sulfide ores and oxidizing actively Fe^{2+} and reduced sulfur compounds – S0, $S_2O_3^{2-}$, $S4O_6^{2-}$, MeS [Kondrat'eva et al., 2015]. Being inhabitants of exploited ore deposits, thermogenesis sites, under conditions of bioleaching of ores and concentrates, sulfobacilli are exposed to impacts of different origin: change of nutrition source (from inorganic to organic one), oscillations in pH and temperature, concentrations of oxygen in the medium, which solubility decreases with temperature increase in acidic media enriched by metal ions including toxic ones. Their growth and development under such diverse conditions are provided by extremely flexible mixotrophic type of metabolism due to a wide spectrum of the enzymes of carbon metabolism formed in the process of evolution. Under aerobic conditions of growth and lack of mineral energy and CO_2 sources bacteria can restructure their metabolism switching to consumption of small amounts of organic compounds (0.01-0.05%) present in the medium. Sulfobacilli are also capable of growth under hypoxic conditions (0.07% of oxygen in the gas phase), at the same time the processes of substrate oxidation are coupled with iron reduction as a terminal electron acceptor. Thus, under extreme and permanently changing conditions, in the process of evolution, sulfobacilli acquired a complicated genome with enzyme apparatus providing for more diverse metabolic possibilities under different conditions of biotechnological process, compared to obligate chemolithotrophs. At the same time, the lack of some key enzymes, e.g. isocitrate lyase of the glyoxylate bypass, was revealed in thermotolerant culture S. thermotolerans (TOPT.40-42OC), moderately thermophilic S. thermosulfidooxidans and S. sibiricus (TOPT.50-55OC). This did not permit bacteria to have sufficient vital metabolite precursors for biosynthetic processes – succinate and propionate – in the cells. As a result, anaplerotic cycle – methylcitrate cycle (MCC) of propionate metabolism – developed in the cells of sulfobacilli. At present time, molecular genetic data on the presence of the genes prpC, prpD и prpB in the cells of sulfobacilli coding for the enzymes of MCC with unique substrate specificity, methylcitrate synthase (MCS), methylcitrate dehydratase (MCD) and methylisocitrate lyase (MCL), respectively, have been received. The functioning of the cycle was proved by a number of stages of conversion of propionyl-CoA formed during β-oxidation of fatty acids with odd numbers of carbons and metabolized in MCC. The highest activity of the enzymes of the three cultures studied belonged to thermotolerant bacteria S. thermotolerans because of the decrease in propionate toxicity with the temperature decline. Conversion of propionyl-CoA to pyruvate and further to phosphoenolpyruvate enables sulfobacilli to use them for gluconeogenesis.

Reference
Kondrat'eva T.F., Bulaev F.G., Muravyov M.I. Microorganisms in biogeotechnologies of sulphide ores processing / Ed. V. F. Galchenko. Moscow: Nauka, 2015. 212 p.

БАКТЕРИАЛЬНОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МАРГАНЦА ИЗ ТЕХНОГЕННЫХ ПРОДУКТОВ

Т.В. Башлыкова, Е.А. Аширбаева, М.В. Пинясов

НИТУ «МИСиС», ООО «НВП Центр-ЭСТАгео»
119049, Москва, Ленинский проспект, д.4

Ключевые слова: биовыщелачивание, марганец, утилизация, техногенное сырье

Мировое потребление марганца неуклонно растет, повышенный спрос различных отраслей промышленности на данный металл способствует вовлечению в переработку месторождений не только природного, но и техногенного происхождения. На территории РФ в настоящее время размещено значительное количество техногенных продуктов с повышенным содержанием в них марганца. В рамках лабораторных исследований были выполнены работы по определению возможности биовыщелачивания марганца из хвостов флотации марганецсодержащей руды, а также отходов производства ферромарганца.

В изученных хвостах флотации содержание оксида марганца составляло 8,14%, основная доля которого была представлена четырехвалентным соединением, которое под действием микроорганизмов восстанавливалось до двухвалентного и только после этого выщелачивалось в раствор. Главным неблагоприятным факторов для проведения биотехнологических процессов являлось нахождение марганца в упорной для доступа микроорганизмов форме: марганецсодержащие минералы находились в плотном срастании с гематитом. С учетом особенностей вещественного состава хвостов флотации было получено извлечение ценного компонента в раствор на уровне 65,21% при его максимальной концентрация в продуктивном растворе 0,94 г/л.

Основными компонентами отходов производства ферромарганца являлись оксиды кремния, кальция и марганца, содержания которых составляли 22,70, 19,40 и 11,43% соответственно. Присутствующий марганец представлен двухвалентной формой, что является благоприятным фактором для проведения биотехнологических процессов. В результате бактериального выщелачивания в стационарных условиях удалось получить извлечение марганца на уровне 99%, при этом его максимальная концентрация в продуктивном растворе составила 4,50 г/л. Основным преимуществом биотехнологии по сравнению с сернокислотным выщелачиванием является низкий расход серной кислоты, являющийся одним из основных фактором, влияющим на экономическую составляющую процессов переработки.

Таким образом, установлено, что биотехнология позволяет извлекать марганец из техногенных продуктов различного состава и происхождения, при этом отвечая требованию по глубокой утилизации перерабатываемого сырья.

.....

BACTERIAL LEACHING OF MANGANESE FROM MAN-MADE PRODUCTS

Bashlykova T. V., Ashirbaeva E. A, Pinyasov M.V.

MISiS, LLC «SIE Center-ESTAgeo»,
Leninsky prospect, 4, Moscow, 119049

Key words: bioleaching, manganese, utilization, technogenic materials

The world consumption of manganese is growing steadily, the increased demand in various industries for the metal promotes involvement in the processing of deposits is not only natural but also man-made origin. On the Russian Federation territory is currently taken a considerable amount of man-made products with a high content of manganese. As part of the laboratory tests were carried out work to determine the feasibility of bioleaching manganese from manganese ore flotation tailings, as well as ferromanganese production waste.

The flotation tailings studied the content of manganese oxide was 8.14%, the bulk of which was provided tetravalent compound which under the action of microorganisms reduced to divalent compound and only then leached into solution. The main adverse factors for biotechnological processes was a present of manganese as hard to access microorganisms form: manganese minerals were in a dense accretion with hematite. Given the characteristics of the material composition of the flotation tailings was obtained the extraction of the valuable component in a solution at 65.21% when its maximum concentration in pregnant solution was 0.94 g/l.

The main components of ferromanganese production waste are silica, calcium oxide and manganese oxide, the content of which were 22.70, 19.40 and 11.43%, respectively. The presents manganese represented by divalent form, which is a favorable factor for biotechnological processes. As a result of bacterial leaching in stationary conditions succeeded in obtaining extraction manganese at 99%, while its maximum concentration in the pregnant solution was 4.50 g/l. The main advantage of biotechnology compared to sulfuric acid leaching is a low consumption of sulfuric acid, which is a major factor in the economic component of the refining process.

Thus, it was found that biotechnology can extract manganese from industrial products of different composition and origin, thus meeting the requirements for deep disposal of feedstock.

.....

УДК 669.213

ПЕРЕРАБОТКА ЗОЛОТОСОДЕРЖАЩИХ ФЛОТОКОНЦЕНТРАТОВ МЕТОДАМИ БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИИ

Арыстанова Г.А., Койжанова А.К., Ерденова М.Б., Абубакриев А.Т.

Акционерное общество «Институт металлургии и обогащения», Алматы, Республика Казахстан
050010, Алматы, ул.Шевченко 29/133
e-mail: guljihan@yandex.ru

Проведено сравнительное изучение переработки золота из флотоконцентратов биогидрометаллургическим методом. Показано, что процесс предварительного биоокисления флотоконцентратов бактериями Acidithiobacillus ferrooxidans позволяет повысить степень извлечения золота на 10,3-15,1% по сравнению с прямым цианированием.

Ключевые слова: биоокисление, флотоконцентрат, цианирование, золото

Формирование ресурсосберегающих технологий в гармонии с биобезопасностью окружающей среды при переработке минерального сырья является одной из наиболее актуальных задач современного мира [1,2]. Несмотря на то, что Казахстан обладает уникальными по количеству и разнообразию минерально – сырьевыми ресурсами проблема обеспечения своих потребностей в минеральном сырье является актуальном и требует инновационных комплексных подходов. В настоящее время на Майкаинской обогатительной фабрике, расположенного на территории Казахстана, с целью расширения сырьевой базы и повышения комплексности использования природного сырья проводятся интенсивные геологоразведочные работы по доизвлечению благородных металлов из трудноупорного сырья. Однако в связи с тем, что золотосодержащее техногенное минеральное образование данного месторождения относится категории упорных проблема извлечения золота и других благородных металлов является существенной. В связи с этим, целью данной работы является сравнительное изучение степени извлечения золота из флотоконцентратов методами биогидрометаллургии. Объектами исследования являлись флотоконцентраты (пиритная, сульфидная, смешанная пробы) техногенных минеральных образований Майкаинской обогатительной фабрики. Для извлечения золота из флотоконцентратов, в которых золото по результатам рационального анализа находится в тонковкрапленном виде в составе породообразующих минералов (основной золотосодержащий сульфид – пирит), а также в виде пленок покрытых кварцем и других минералов, наиболее оптимальным и перспективным способом является использование метода биогидрометаллургии. Сущность метода переработки заключается в предварительном биоокислении флотоконцентратов ацидофильными хемолитотрофными бактериями Acidithiobacillus ferrooxidans в течение 120 ч с последующим цианированием (0,1% NaCN). В результате проведенных опытов установлено, что при прямом цианировании флотоконцентратов без предварительного окисления степень извлечения золота в среднем составила 50% (пиритная – 50,1%, сульфидная – 42,7%, смешанная – 48,4%). При вовлечение процесс извлечения золота предварительное биоокисление степень извлечения золота в среднем составила 59% (наибольший показатель отмечен в пиритной – 60,5%, далее в смешанной – 58,7% и сульфидной – 57,8% пробах). Это обусловлено тем, что при биоокислении идет разрушение пирита, в результате чего золото переходит в легкодоступную форму для цианидного раствора.

На основании выполненных исследований установлено, что использование хемолитотрофных микроорганизмов в процессе биоокисление флотоконцентратов позволяет увеличить степень извлечения золота в пиритной пробе на 10,4%, в сульфидной на 15,1%, в смешанной на 10,3%. Положительные результаты, полученные с использованием методов биогидрометаллургии в процессе переработки золотосодержащих флотоконцентратов перспективе могут быть применимы в технологических процессах в условиях Майкаинской обогатительной фабрики.

Литература:

1. *Chanturya V. A.et.al. Non traditional highly effective breaking up technology for resistant gold containing ores and beneficiation products // Proceeding of XXII IMPC. – Cape Town, 2003. – P. 137-149.*
2. *Гурин К.К. и др. Извлечение золота из хвостов золотоизвлекательной фабрики от переработки упорных руд смешанного типа // Цветные металлы. – 2013. – №5. – С.39-43.*

UDC 669.213

PROCESSING OF GOLD-CONTAINING FLOTATION CONCENTRATES BY BIOHYDROMETALLURGY METHODS

Arystanova G.A., Koyzhanova A.K., Erdenova M.B., Abubakriev A.T.

Joint-stock company «Institute of Metallurgy and Ore Benefication», Almaty, Republic of Kazakhstan
050010, Almaty, Shevchenko St. 29/133
e-mail: guljihan@yandex.ru

A comparative study of the processing of gold from the flotation concentrates by biohydrometallurgical methods has been carried out. It has been shown that the process of preliminary bio-oxidation of flotation concentrates by Acidithiobacillus ferrooxidans bacteria allows the degree of gold extraction of to increase to 10,3 and 15,1% compared to direct cyanidation.

Key words: bio-oxidation, the flotation concentrate, cyanidation, gold

The formation of resource-saving technologies is one of the most pressing global challenges in tune with the environmental biosecurity in the processing of mineral raw materials [1-2]. Despite the fact that Kazakhstan has got a unique number and variety of mineral resources, the issue of ensuring its needs with mineral raw materials is urgent and requires an innovative integrated approaches. Currently, an intensive exploration is been holding on the additional extraction of precious metals from hard resistant raw materials in Maykainsky processing factory, which is located on the territory of Kazakhstan, with the aim of expanding the raw material base and increasing the complexity of the use of natural raw materials. However, due to the fact that the gold of technogenic mineral formation of this field is essential and it lies in the category of the hard problem of extracting gold and other noble metals. In this regard, the goal objective of this research work is the comparative study of the degree of gold extraction from flotation concentrates by biohydrometallurgy methods. The objects of study have been the flotation concentrates (pyrite, sulfide, mixed, new sulphide samples) of technogenic mineral formations in Maykainsky factory. For the extraction of gold from flotation concentrates, in which gold was as the results of rational analysis in the composition of rock-forming minerals (the main gold-bearing sulphide – pyrite), as well in the form coated with quartz, hydroxides, carbonates, chlorites and other minerals, the most optimal and promising method is the use of the biohydrometallurgy method. The essence of the processing method is in the preliminary biooxidation of the flotation concentrates with chemolithotrophic acidophilic bacteria Acidithiobacillus ferrooxidans for 120 hours, followed by cyanidation (of 0,1% NaCN). As a result of tests it has been established that the level of gold extraction consists of 50% in average (pyrite – 50,1%, sulfide – 42,7%, combined – 48,4%) in direct flotation concentrates cyanidation without pre-oxidation. When the engagement process of gold extraction a preliminary bio-oxidation degree of gold recovery was 59% in average (the highest rate was observed in pyrite – 60,5%, further in the mixed – 58,7% sulphide – 57,8% of the samples). This is because of happening the destruction of pyrite in bio-oxidation, as a result that the gold goes in easily accessible form in cyanide liquid. On the basis of the investigated researches it has been staded that the use of chemolitotrophic of microorganisms in the process of biooxidation of a flotation concentrates allows the degree of gold extraction to increase the sample to10,4% in pyrite, and to 15,1% in sulfide, to 10,3% in mixed way. The positive results obtained using the biohydrometallurgy methods in the processing of gold-containing flotation concentrates term can be applied in technological processes in the conditions of Maykainsky factory.

References:

1. *Chanturya V. A.et.al. Non traditional highly effective breaking up technology for resistant gold containing ores and beneficiation products // Proceeding of XXII IMPC. – Cape Town, 2003. – P. 137-149.*
2. *Gurin K.K. et.al. Gold extraction from tailings gold processing plant from processing refractory ore of mixed type // Non-ferrous metals. – 2013. – №5. – C.39-43.*

УДК 66.061.34+579.66

УСТОЙЧИВОСТЬ К ИОНАМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ШТАММОВ АРХЕЙ РОДА ACIDIPLASMA

Булаев А.Г.,[1,2] Ерофеева Т.В.[1]

[1]Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия,
119234 Москва, Ленинские горы, д. 1
[2]Институт 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
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Была исследована устойчивость штаммов рода Acidiplasma к ионам меди и цинка. Было показано, что исследуемые штаммы способны окислять двухвалентное железо в присутствии 1000 мМ меди и цинка, но даже низкие концентрации тяжелых металлов подавляли их рост.

Ключевые слова: биогидрометаллургия; ацидофильные микроорганизмы; экстремофилы, археи, Ferroplasmaceae, Acidiplasma

Биогидрометаллургические технологии широко применяются для добычи цветных и благородных металлов из сульфидных руд. Окислители сульфидных минералов представляют собой филогенетически неоднородную группу. В нее входят представители нескольких филумов доменов Bacteria (Proteobacteria, Nitrospirae, Firmicutes, Actinobacteria) и Archaea (Euryarchaeota, Crenarchaeota). Одной из доминирующих групп микроорганизмов в процессах биовыщелачивания являются археи рода Acidiplasma семейства Ferroplasmaceae. Археи семейства Ferroplasmaceae распространены в местах обитания, характеризующихся низкими значениями pH, таких как месторождения сульфидных руд, шахты и карьеры, кислые геотермальные источники. Археи рода Acidiplasma – аэробные окислители железа, но нуждаются в органическом источнике углерода и способны к гетеротрофному росту. Так как данные археи получают энергию за счет окисления сульфидных минералов, места их обитания зачастую характеризуются высокими концентрациями ионов тяжелых металлов. В литературе отсутствует информация об устойчивости архей рода Acidiplasma к ионам тяжелых металлов. В данной работе была изучена устойчивость штаммов архей рода Acidiplasma (Acidiplasma sp. MBA–1 и A. cupricumulans BH2T) к ионам меди и цинка. Для проведения опытов использовалась среда, содержавшая 5 г/л Fe^{2+} и 0.02% дрожжевого экстракта в качестве питательных субстратов. Для проведения экспериментов в среду добавляли тяжелые металлы (Cu^{2+} или Zn^{2+}) в виде сульфатов в следующих концентрациях: 0 мМ, 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ, 100 мМ, 250 мМ, 500 мМ, 750 мМ, 1000 мМ. Продолжительность экспериментов составляла 10 суток, эксперименты проводили при 50°C. Устойчивость штаммов к ионам тяжелых металлов оценивалась по росту микроорганизмов (количество клеток в жидкой фазе) и по способности окислять двухвалентное железо. Было обнаружено, что оба штамма были способны к окислению железа во всем диапазоне концентраций меди и цинка (0 мМ – 1000 мМ). Однако при концентрациях меди выше 10 мМ и цинка выше 50 мМ скорость окисления железа обоими штаммами существенно снижалась по сравнению с контролем (среда без меди и цинка). При этом даже низкие концентрации меди и цинка подавляли рост микроорганизмов. В геномах штаммов (JYHS00000000.1 и LKBH00000000.1) был осуществлен поиск генов, кодирующих белки, которые потенциально могут обуславливать устойчивость к ионам металлов. В геномах штаммов были обнаружены гены ABC (ATP-binding cassette transporters) и MFS (major facilitator superfamily) транспортеров, которые могут учувствовать в удалении ионов тяжелых металлов из цитоплазмы, а также гены белков, способных к связыванию меди (copper-binding proteins). Кроме того, в геномах были обнаружены белки семейства Ars, ответственные за устойчивость к мышьяку.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60053 мол_а_дк.

RESISTANCE OF ARCHAEA OF THE GENUS ACIDIPLASMA TO HEAVY METALS

Bulaev A.G.,[1,2] Erofeeva T.V.[1]

[1] Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia
119071 Moscow, 1, bld. 12 Leninskiye Gory.
[2] Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences. Moscow, Russia
119071 Moscow, 33, bld. 2 Leninsky Ave.
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Resistance of the strains of the genus Acidiplasma to copper and zinc ions was evaluated. It was shown that studied strains were able to oxidize ferrous iron in presence of 1000 mM of copper and zinc, whereas even low concentrations inhibited their growth.

Ключевые слова: biohydrometallurgy, acidophilic microorganisms, extremophiles, archaea, Ferroplasmaceae, Acidiplasma

Biohydrometallurgical technologies are widely used to extract non-ferrous and noble metals from sulfide ores. Microorganisms oxidizing sulfide minerals constitute phylogenetically heterogeneous group. This group includes representatives of both Bacteria (Proteobacteria, Nitrospirae, Firmicutes, Actinobacteria) and Archaea (Euryarchaeota, Crenarchaeota). Archaea of the genus Acidiplasma of the family Ferroplasmaceae is one of predominating groups of microorganisms in bioleaching processes. Archaea of the family Ferroplasmaceae are widespread in the habitats characterized by low pH such as sulfide ores deposits, mines and open pits, and acid geothermal springs. Representatives of the genus Acidiplasma are aerobic iron oxidizing microorganisms but they require organic source of carbon and capable of heterotrophic growth. As these archaea obtain energy by means of oxidation of sulfide minerals, their habitats are often characterized by high concentrations of heavy metals. The data on resistance of these archaea to heavy metals ions are not presented in literature. In the present study, resistance of the strains of the genus Acidiplasma (Acidiplasma sp. MBA–1 and A. cupricumulans BH2T) to copper and zinc ions was studied. Nutrient medium containing 5 g/L of Fe^{2+} and 0.02% of yeast extract (YE) was used in the experiments. The medium was supplemented with copper and zinc sulfates in the following concentrations 0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM, 1000 mM. The experiments were performed at 50°C for 10 days. Growth of microorganisms (cell number in the liquid medium) and oxidation of ferrous iron were criteria for assessment of the resistance. It was revealed that both strains were able to oxidize ferrous iron in presence of 0 to 1000 mM of copper and zinc. In the same time, rates of ferrous iron oxidation by both strains in presence of 10 mM of copper and 50 mM of zinc were considerably lower than in control experiments (without copper and zinc). Low concentrations of heavy metals ions inhibited growth of the microorganisms. Genes coding for the proteins potentially involved in the resistance to heavy metals were found in the genomes of the strains (JYHS00000000.1 and LKBH00000000.1). Genes coding for ABC (ATP-binding cassette transporters) and MFS (major facilitator superfamily), which can be involved in removal of heavy metals ions from cytoplasm, as well as genes coding for copper-binding proteins were revealed in the genomes. Furthermore, genes of Ars-transporters responsible for resistance to arsenic were also found in the genomes.

The reported study was funded by RFBR, according to the research project No. 16-34-60053 mol_a_dk.

УДК: 579.2

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ УРАНОВЫХ РУД РАЗЛИЧНЫХ УРАНОВЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ УЗБЕКИСТАНА

Калиниченко З.В., Тащканбаев О.Н., Исламов Б.Ф., Сагдиева М.Г.

Государственное предприятие «Научно-исследовательский институт минеральных ресурсов», Ташкент, Республика Узбекистан
100060, Ташкент, ул. Т. Шевченко, дом 11 а
e-mail: kalinichenko.z.v@gmail.com

Проведены исследования микробиологического состава урановых руд некоторых урановых месторождений республики Узбекистан. Показано, что микрофлора представлена в основном представителями гетеротрофных микроорганизмов.

Ключевые слова: урановые руды, микрофлора, керн, технологические растворы, хемолитоавтотрофные бактерии, гетеротрофные микроорганизмы.

В настоящее время основная масса урана добывается подземным кислотным выщелачиванием, однако данная технология в последнее время становится нерентабельным из-за значительного расхода серной кислоты при переработке высококарбонатных руд Кызылкумского региона и образования гипсов, оказывающих негативное влияние на в процессе подземного выщелачивания. Кроме того, кислотное выщелачивание требует больших затрат энергии и включает комплекс установочных операций. Альтернативным методом является микробиологическое выщелачивание, которое в последнее время широко развивается в ряде стран мира.

Целью настоящей работы служило изучение микрофлоры некоторых действующих участков урановых месторождений Республики Узбекистан. Материалом исследований служили технологические растворы и руды (керн) представленные зеленовато-серым не окисленным песчаником, некоторых действующих скважин.

Для определения микробиологического состава исследуемых проб проводили разведение с последующим посевом на различные питательные среды. Численность микроорганизмов определяли методом серийных десятикратных разведений с последующим высевом на соответствующие твердые питательные среды. В таблице приведена численность различных видов и физиологических групп микроорганизмов, выделенных на различных питательных средах (пробы 1 и 2 – технологические растворы, пробы 3 и 4 – керны).

Таблица

Численность микроорганизмов, выделенных и з различных проб урановых руд

	Микроорганизмы	**Технологические растворы**		**Керн**	
		Проба № 1	Проба № 2	Проба № 3	Проба № 4
хемолитоавтофы	*A.ferrooxidans*	$1,3x10^1$	$0,6x10^1$	-	$2,5x10^2$
	A. thiooxidans	$2,5x10^2$	$2,5x10^2$	$2,5x10^2$	$2,5x10^3$
	A. intermedius	-	-	$2,5x10^4$	$2,5x10^2$
	A. denitrificans	-	-	$6,0x10^4$	$0,6x10^1$
	A. thioparus	-	$2,5x10^1$	$2,5x10^4$	$0,6x10^1$
	Другие тионовые бактерии	$6,0x10^4$	$6,0x10^3$	$2,5x10^4$	$2,5x10^2$
гетеротрофы	Азотофиксаторы	$2,5x10^4$	$2,5x10^5$	$2,5x10^3$	$2,5x10^2$
	Нитрофикаторы	$2,5x10^4$	$6x10^4$	$2,5x10^4$	$6,0x10^3$
	Денитрофикаторы	$2,5x10^4$	$2,5x10^3$	$2,5x10^4$	$2,5x10^3$
	Аммонификаторы	$2,5x10^4$	$2,5x10^4$	$6,0x10^4$	$2,5x10^4$
	Целлюлозодеструкторы	-	-	$2,5x10^4$	$2,5x10^3$
	Мицелиальные грибы	$1,0x10^1$	$2,0x10^2$	-	$2,5x10^2$
	Актиномицеты	-	$1,0x10^1$	-	$2,0x10^1$
	Дрожжи	-	-	-	-

Как видно из данных таблицы, численность гетеротрофных микроорганизмов в значительной степени выше, чем численность хемоавтолитотрофных бактерий. Следует отметить также, что количество микроорганизмов выделенных из проб керна выше, чем численность микроорганизмов в технологических растворов. Количество мицелиальных грибов не превышает 2,5x102 кл/г, практически во всех исследованных пробах отсутствуют дрожжи.

Полученные данные свидетельствуют о роли микроорганизмов в биогеотехнологических процессах, происходящих в действующих скважинах в процессе подземного выщелачивания.

DIVERSITY OF MICROORGANISMS URANIUM ORE DIFFERENT URANIUM DEPOSITS OF UZBEKISTAN

Kalinichenko Z.V., Tashkanbaev O.N., Islamov B.F., Sagdieva M.G.

State Enterprise «Scientific Research Institute of Mineral Resources», Tashkent, Republic of Uzbekistan
T.Shevchenko Str., 11/A Tashkent, 100060
e-mail: kalinichenko.z.v@gmail.com

Investigations of microbiological composition of some uranium ores of uranium deposits of the Republic of Uzbekistan were carried out. It is shown that the microflora represented mainly by representatives of heterotrophic microorganisms.

Key words: uranium ores, flora, core, technological solutions, hemolitoavtotrofnye bacteria, heterotrophic microorganisms.

Currently, the main bulk of the uranium mined by underground acid leaching, but present technology has recently become unprofitable because of the significant flow of sulfuric acid in the processing of high carbonaceous ores of Kyzylkum region and the formation of gypsum that have a negative impact on the in-situ leaching process. In addition, acid leaching requires a lot of energy and involves a complex installation operations. An alternative method is microbiological leaching, which has recently been developed in some countries.

The aim of this work is a study of the flora of some existing areas of uranium deposits in Uzbekistan. The material of the research served as the technological solutions and ore (core) presented a greenish-gray sandstone is not oxidized, some of the existing wells.

To determine the composition of the microbial cultivation of samples were carried out, followed by seeding various culture media. The number of microorganisms was determined by serial tenfold dilutions on followed by sowing the appropriate solid nutrient medium. The table below shows the number of different species and physiological groups of microorganisms isolated in different nutrient media (samples 1 and 2 – technological solutions, samples 3 and 4 – cores).

Table

THE NUMBER OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM VARIOUS URANIUM ORE SAMPLES

microorganisms	microorganisms	Technological solutions		core sample	
		sample № 1	sample № 2	sample № 3	sample № 4
hemolitoavtofy	*A.ferrooxidans*	$1,3x10^1$	$0,6x10^1$	-	$2,5x10^2$
	A. thiooxidans	$2,5x10^2$	$2,5x10^2$	$2,5x10^2$	$2,5x10^3$
	A. intermedius	-	-	$2,5x10^4$	$2,5x10^2$
	A. denitrificans	-	-	$6,0x10^4$	$0,6x10^1$
	A. thioparus	-	$2,5x10^1$	$2,5x10^4$	$0,6x10^1$
	Other thiobacteria	$6,0x10^4$	$6,0x10^3$	$2,5x10^4$	$2,5x10^2$
heterotrophs	nitrogen fixers	$2,5x10^4$	$2,5x10^5$	$2,5x10^3$	$2,5x10^2$
	Nitrofikatory	$2,5x10^4$	$6x10^4$	$2,5x10^4$	$6,0x10^3$
	Denitrofikatory	$2,5x10^4$	$2,5x10^3$	$2,5x10^4$	$2,5x10^3$
	ammonifiers	$2,5x10^4$	$2,5x10^4$	$6,0x10^4$	$2,5x10^4$
	Tsellyulozodestruktory	-	-	$2,5x10^4$	$2,5x10^3$
	filamentous fungi	$1,0x10^1$	$2,0x10^2$	-	$2,5x10^2$
	actinomycetes	-	$1,0x10^1$	-	$2,0x10^1$
	Yeast	-	-	-	-

As seen from the table, the number of heterotrophic microorganisms largely higher than the number hemolitoavtrofy bacteria. It should also be noted that the number of microorganisms isolated from core samples greater than the number of microorganisms in industrial fluids. Number of filamentous fungi does not exceed 2,5h102 cells / g, almost all the investigated samples yeast are absent.

The findings suggest that the role of microorganisms in biogeotehnological processes in existing wells in the process of in-situ leaching.

СЕКЦИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

SECTION

BIOLOGICAL TRANSFORMATIONS OF CONTAMINANTS IN THE NATURAL ENVIRONMENT: PATTERNS AND PRACTICAL ASPECTS

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 579.64.57.053

ВЛИЯНИЕВ РЕАЛИЗАЦИИ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОБНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ.

Градова Н.Б.

Российский химико-технологический университет им. Менделеева Д.И, Москва, РФ
Адрес для переписки:125427, Москва, Миусская пл.9. тел.8-916-175-31-15

Анонс. Функциональная активность биопрепаратов, основанных на реализации физиолого-биохимического потенциала живых клеток микроорганизмов в почве, определяется присутствием в почвах микроэлементов, входящих в активный центр ферментов, определяющих их функциональную активность.

Ключевые слова: микробные препараты, функциональная активность, почва, микроэлементы

Разработка технологических процессов получения и применения широкого круга биопрепаратов, функциональная активность которых основана на реализации физиолого-биохимического потенциала живых клеток микроорганизмов, в частности биопрепаратов, используемых для повышения плодородия почв (азотобактерин) и биоремедиации нефтезагрязнённых почв, является одной из инновационных областей развития биотехнологии. Технология получения таких биопрепаратов включает стадии глубинного периодического или непрерывного культивирования селекционированных штаммов микроорганизмов на полноценных питательных средах, содержащих как макро- так и микроэлементы, обеспечивающие реализацию их физиолого-биохимического потенциала, их функциональную активность. Внесение в почву данных препаратов при их применении является, практически, стадией твёрдофазного культивирования микроорганизмов препаратов. Анализ литературы и практических инструкций по технологии применения препаратов показывает, что разработчиками выдвигаются требования по созданию условий, обеспечивающих физиологическую активность препаратов (влажность, температура, аэрируемость, pH, обеспеченность NPK и

др.). При этом не учитывается необходимость обеспечения их биохимического потенциала, содержания в почвах микроэлементов, входящих в активный центр ферментов, определяющих их функциональную активность, соответственно железа и молибдена. Содержание микроэлементов в почвах разных почвенно-климатических зон и разной степени окультуренности значительно различаются. Экспериментально показано, что при применении азотобактерина внесение в молибден – недостаточную дерново-подзолистую почву Na_2MoO_4 в концентрации 5 и 10мг/кг содержание азота в почве повышается, соответственно на 17 и 25%. При внесении в почву железа, входящего в активный центр ферментов, участвующих в окислении углеводородов в концентрации 35мг/кг, при применении биопрепарата, включающего штаммы бактерий Rhodococcus erythropolis и дрожжей C.tropicalis, на 28 сутки экспозиции содержание углеводородов в почве снизилось на 33% по сравнению с контролем. Таким образом, показано, что функциональная активность микробных препаратов зависит от использования их биохимического потенциала, который может быть лимитирован отсутствием значимых микроэлементов.

EFFECT OF THE IMPLEMENTATION OF BIOCHEMICAL POTENTIAL OF MICROORGANISMS ON MICROBIAL INOCULANTS FUNCTIONAL ACTIVITY.

Gradova N.B.

Russian Chemical-Technological University. DI Mendeleev, Moscow, Russian FederationAddress for correspondence: 125427, Moscow, Miusskaya pl.9.
Phone 8-916-175-31-15

Announcement. Functional activity of biological products that is based on the implementation of the physiological and biochemical potential of living cells of microorganisms in the soil. It is determined by the presence of trace elements in soils within the active site of enzymes that define their functional activity.

Key words: microbial preparations, functional activity, soil, microelements

One of the cutting-edge fields of biotechnology is the development of technological processes of production and usage of a wide range of biological products, the functional activity of which is based on the realization of the physiological and biochemical potential of living cells of microorganisms. The biological products that are used to improve soil fertility (Azotobacterin) and bioremediation of oil-contaminated soil are of a great scientific interest.The production technology of such biological products includes deep stage batch or continuous cultivation of selected strains of microorganisms in the full nutrient media containing both macro- and micronutrients, which provide the realization of the physiological and biochemical potential of biological products functional activity. Introduction of these products into the soil can be described as a stage of solid-phase cultivation of microorganisms products. Review of literature and practical instructions for the application of these products showed that specific conditions such as humidity, temperature, aeration, pH, availability of NPK etc should be kept in mind to ensure the physiological activity of preparations. It does not take into account the need to ensure their biochemical capacity, presence of elements such as iron and molybdenum in the soil that belong to the active site of enzymes and defining their functional activity.

The content of trace elements in soils vary significantly depending on climatic zones and degrees of cultivation. Experiments have shown that application of azotobacterin into soil with lack of molybdenum sod-podzolic soils Na_2MoO_4 at 5 and 10 mg / kg, concentration of nitrogen in the soil increased respectively, by 17 and 25%.

Iron plays important part in active site of enzymes that are involved in the process of hydrocarbons oxidation at a concentration of 35mg / kg. When iron was added into the soil with the biological product comprising strains of bacteria Rhodococcus erythropolis and yeast C.tropicalis, after 28 days of exposure the concentration of hydrocarbons decreased by 33% compared to the control sample.

Thus, it was shown that the functional activity of microbial products depends on their biochemical potential, which may be limited by the lack of important microelements.

УДК 631.46.5798.017.735

РОЛЬ ПЛАЗМИД В БИОДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ

Филонов А.Е.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, Россия
142290, Московская обл., г. Пущино, пр-т Науки, д. 5
email: filonov.andrey@rambler.ru

Изучена роль катаболических плазмид в процессах бактериальной деградации углеводородов нефти. Показана стимуляция загрязнителем переноса плазмид и интенсифицирующее влияние распространения плазмид на микробный катаболизм углеводородов.

Ключевые слова: плазмиды; бактерии; биодеградация; углеводороды; нефть; перенос плазмид

Плазмиды играют важную роль в адаптации микроорганизмов к изменяющимся условиям окружающей среды. Эти генетические детерминанты позволяют содержащим их микроорганизмам катаболизировать устойчивые в окружающей среде соединения, например, ароматические углеводороды, которые неспособны разлагать большинство известных микроорганизмов. Описано много примеров участия плазмидных генов в деградации углеводородов, в том числе короткоцепочечных алканов, замещенных и незамещенных ароматических углеводородов и других ксенобиотиков (Sayler, 1990; Wallace et al., 1992; Harayma et al., 1990; Top et al., 2002).

Проводили изучение утилизации нефти плазмидосодержащими штаммами-деструкторами рода Pseudomonas по сравнению с их бесплазмидными вариантами для выявления роли катаболических плазмид в данном процессе. Впервые показано, что наличие плазмид биодеградации ароматических углеводородов в штаммах-хозяевах приводит к увеличению степени деструкции нефти и численности плазмидосодержащих бактерий в жидкой минеральной среде и в почвенных микрокосмах. Были получены результаты показывающие, что важным аспектом катаболического потенциала микроорганизмов в процессе деструкции нефти является комбинация «бактериальный хозяин — плазмида».

Наличие плазмид в штаммах обусловило и изменение фракционного состава в остаточной нефти. Было обнаружено увеличение степени деструкции гексановой, бензольной и бензольно-спиртовой фракций, по сравнению с результатами, полученными при использовании бесплазмидных штаммов.

Изучение горизонтального переноса плазмид проводили как в модельных системах, так и в открытой почве на территории очистных сооружений г. Пущино. Для этого были получены маркированные штаммы и плазмиды, а также разработан метод мониторинга интродуцированных в почву штаммов. Обнаружен горизонтальный перенос аборигенных плазмид биодеградации в интродуцированный штамм-реципиент Pseudomonas putida KT2442 и меченой плазмиды из интродуцированного плазмидосодержащего штамма Pseudomonas putida KT2442(pNF142::Tc) в аборигенные почвенные бактерии, близкие к видам Pseudomonas lini, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas jessenii, Pseudomonas frederiksbergensis, Pseudomonas graminis, Pseudomonas putida. Показано, что в открытой окружающей среде и в лабораторных экспериментах происходило ускорение процесса деградации модельного поллютанта (нафталина), как за счет кооперации аборигенных штаммов-деструкторов и трансконъюгантов,

Таким образом, интродукция микроорганизмов – потенциальных доноров плазмид биодеградации ароматических углеводородов, может интенсифицировать процессы очистки и повышать биодеградативный потенциал микробных популяций в загрязненных углеводородами экосистемах путем переноса плазмид и генов биодеградации в эндогенные микроорганизмы.

THE ROLE OF PLASMIDS IN HYDROCARBONS BIODEGRADATION

Filonov A.E.

G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Russia
142290, Moscow Region, Pushchino, prospect Nauki, 5
email: filonov.andrey@rambler.ru

The role of catabolic plasmids in petroleum hydrocarbons degradation by bacteria has been studied. Pollutant stimulation of plasmid transfer and intensifying effect of plasmid dissemination to hydrocarbons microbial catabolism has been shown.

Key words: plasmids; bacteria; biodegradation; hydrocarbons; petroleum; plasmid transfer

Plasmids play an important role in adaptation of microorganisms to changing environmental conditions. These genetic determinants let their hosts assimilate recalcitrant compounds, e.g. aromatic hydrocarbons that are not

readily metabolized by the most of known microorganisms. Many facts of plasmids participation in hydrocarbon degradation have been opened, including short-chain alkanes, substituted and non-substituted aromatic hydrocarbons and many xenobiotics (Sayler, 1990; Wallace et al., 1992; Harayma et al., 1990; Top et al., 2002).

The study for petroleum utilization by plasmid-bearing degrader Pseudomonas strains in comparison with plasmid-free variants to reveal the role of catabolic plasmids in biodegradation process. The presence of plasmids of aromatic hydrocarbons biodegradation in host strains have been first shown to increase the degree of petroleum destruction and the number of plasmid-harbouring bacteria in liquid mineral medium and soil microcosms. Results obtained show a "plasmid – bacterial host combination" to be an important aspect of microbial catabolic potential in petroleum degradation.

The presence of plasmids in strains provided a change of fractions in residual petroleum. An increase of the degradation degree for hexane, benzene and benzene-spirit fractions was observed as compared with results for plasmid-free strains.

The study of horizontal plasmid transfer was performed both in model systems and open soil on a municipal refinery territory, Pushchino. Previously tagged strains and plasmids as well as a method of monitoring strains introduced into the soil were elaborated. Horizontal transfer of indigenous biodegradation plasmids into an introduced recipient strain Pseudomonas putida KT2442 and the transfer of the tagged plasmid from the introduced donor Pseudomonas putida KT2442(pNF142::Tc) into indigenous soil bacteria closely related to species Pseudomonas lini, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas jessenii, Pseudomonas frederiksbergensis, Pseudomonas graminis, Pseudomonas putida, has been detected. In open environment and laboratory experiments an enhancement of model pollutant (naphthalene) degradation occurred because of indigenous degrader strains and transconjugants cooperation.

Thus, the introduction of microorganisms – potential donors of aromatic hydrocarbons biodegradation plasmids may intensify clean-up processes and enhance biodegradative potential of microbial populations in hydrocarbon-spilled ecosystems by biodegradation gene and plasmid transfer into indigenous microorganisms.

УДК 579.64

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ЭНДО- И РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ

Беловежец Л.А., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Макарова Л.Е

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Со РАН, Иркутск, Россия
664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1.
e-mail: lyu-sya@yandex.ru

Из эндо- и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненных почвах, были выделены культуры микроорганизмов, обладающие высокой нефтедеструктирующей активностью. Показано, что все штаммы способны работать при высоких концентрациях нефти в питательной среде и низких температурах. На их основе созданы ассоциации, максимально эффективно деструктирующие нефть.

Ключевые слова: нефтедеструкция, микроорганизмы, эндо- и ризосфера растений.

Проблема рекультивации загрязненных нефтью почв остается одной из наиболее экологически значимых. Применение для этой цели микроорганизмов-нефтедеструкторов на сегодняшний день является «золотым стандартом», однако имеет ряд ограничений. Так, уровень загрязнения не должен превышать 5%, что не позволяет использовать этот метод для свежих проливов нефти.

Нами было выделено 115 культур эндо- и ризосферных микроорганизмов, проведен их первичный скрининг по способности утилизировать нефть. Показано, что 6 наиболее активных штаммов, относящихся к родам Acinetobacter, Pseudomonas, Rhodococcus, способны эффективно разлагать нефть при концентрации ее в среде до 20%, а также выживать при концентрации нефти 50%.

Известно, что ассоциации микроорганизмов способны гораздо эффективнее разлагать нефть, чем индивидуальные штаммы. Это связано, прежде всего, с разнообразием ферментов, вырабатываемых каждым микроорганизмом, что приводит к более полному разрушению сложных химических структур, составляющих нефть. Мы проверили несколько различных по видовому составу композиций, причем для ассоциаций изначально были созданы достаточно жесткие условия – исходная концентрация нефти в питательной среде составляла 10%. Показано, что убыль нефти через 2 месяца культивирования была на уроне 25-30%, т.е. все композиции эффективно разлагали нефть. Наилучшей нефтедеструктирующей активностью обладали совместно культивируемые штаммы Acinetobacter.

Для изучения способности микроорганизмов разлагать нефть при низких положительных температурах была проведена серия экспериментов по оценке степени убыли нефти ассоциациями микроорганизмов при температурах 4 и 10оС. Установлено, что при температуре близкой к нулю разложение нефти практически не происходит (убыль нефти не превышает 3.5%). В тоже время при незначительном повышении температуры скорость деструкции повышается. Особенно выделяется ассоциация 2 штаммов Acinetobacter, где убыль нефти составила 15%.

Таким образом, нами создана ассоциация микроорганизмов, способная эффективно разлагать нефть при ее высоких концентрациях и низких положительных температурах окружающей среды.

UDK 579.64

PROMISING NEW OIL DESTRUCTORS MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE ENDO- AND RHIZOSPHERE OF PLANTS

Belovezhets L.A., Tretyakova M.S., Markova Y.A., Makarova L.E.

Irkutsk Institute of Chemistry. SB RAS, Irkutsk, Russia
664033, Favorsky str., 1.
e-mail: lyu-sya@yandex.ru

From endo – and rhizosphere of plants growing in oil polluted soils was isolated cultures of microorganisms having high neftegastruba activity. It is shown that all strains are capable of operating at high concentrations of oil in the medium and low temperatures. On the basis of their established Association, effectively degraded the oil.

Key words: oil destruction, microorganisms, endo- and rhizosphere of plants.

The problem of remediation of oil remains one of the most ecologically significant. Application for this purpose-microbial oil destructors today is the «gold standard», but has some limitations. Thus, the pollution level should not exceed 5%, which does not use this method for fresh oil spills.

We have allocated 115 strains endo- and rhizosphere microorganisms, held their primary screening for the ability to dispose of the oil. It is shown that six of the most active strains belonging to species Acinetobacter, Pseudomonas, Rhodococcus, are capable of effectively degrading oil when its concentration in the environment up to 20%, and to survive in a concentration of 50% oil.

It is known that the association of microorganisms capable of degrading oil much more efficiently than individual strains. This is due, above all, with a variety of enzymes produced by each microorganism, which leads to a total destruction of the complex chemical structures that constitute the oil. We tested a number of different species composition compositions, and for associations were originally created rather tough conditions – the initial concentration of oil in the medium was 10%. It is shown that the loss of oil through 2 months of cultivation was on a loss of 25-30%, all songs effectively decomposed oil. The best oil-destruction activity had co-cultured strains of Acinetobacter.

To study the ability of microorganisms to degrade oil at low positive temperatures, a series of experiments to assess the degree of loss of oil microbial associations with temperatures of 4 and 10 ° C. It is found that at a temperature close to zero expansion is practically no oil (decrease oil does not exceed 3.5%). At the same time, with a slight increase in temperature increased the degradation rate. The most prominent association 2 strains of Acinetobacter, where the decline was 15% of oil.

Thus, we have an association of microorganisms that can efficiently degrade oil at its higher concentrations of positive and low ambient temperatures.

УДК 579.8:553.982

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В МЕСТОРОЖДЕНИЯХ ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ

Соколова Д. Ш., Бабич Т. Л., Семёнова Е. М., Борзенков И. А., Турова Т. П., Назина Т. Н.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, корп. 2
e-mail: sokolovadiyana@gmail.com

Исследованы физико-химические и микробиологические характеристики пластовых вод месторождений тяжелой нефти (РФ). Показано, что незаводняемые нефтяные пласты содержат малочисленное микробное сообщество, численность микроорганизмов в заводняемых пластах достигала 106 кл/мл. Скорости процессов сульфатредукции и метаногенеза были низки. Состав микробных сообществ пластовой воды из месторождений тяжелой нефти исследован методом высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК. Выделены бактерии родов Acinetobacter, Pseudomonas, Bacillus и Gordonia, способные образовывать биосурфактанты, полезные для вытеснения нефти.

Ключевые слова: нефтяные пласты, тяжелая нефть, микроорганизмы, гены 16S рРНК, высокопроизводительное секвенирование, биогеохимические процессы, микробные биотехнологии повышения нефтеотдачи

Во многих нефтедобывающих странах месторождения с легкой кондиционной нефтью уже выработаны, поэтому всё большее значение приобретают технологии извлечения тяжёлой нефти, характеризующейся плотностью более 0.92 г/см³. Геологические запасы тяжелой и высоковязкой нефти в России достигают 6–7 млрд. тонн, однако их извлечение требует применения дорогостоящих технологий, что увеличивает себестоимость добычи. Биологическое воздействие на тяжёлую нефть характеризуется высокой избирательностью в отношении специфических реакций, способствующих улучшению свойств тяжелой нефти, и может представлять альтернативный подход для повышения нефтеотдачи. В настоящее время информация о микроорганизмах месторождений тяжелой нефти остается фрагментарной. Целью работы является определение функционального и филогенетического разнообразия микроорганизмов в месторождениях тяжелой нефти для разработки микробиологического метода интенсификации добычи тяжелой нефти.

На месторождениях тяжелой нефти, расположенных на территории Республики Татарстан и Волгоградской области, были отобраны 23 пробы пластовой воды и нефти. Нефтяные пласты залегали на глубине от 859 до 1316 м и имели температуру от 22°C до 25°C. Плотность нефти варьировала от 0.890 до 1.316 г/см3 (при 25°C), вязкость нефти – от 198 до 280 мПа сек. Исследовали как заводняемые (Восточно-Анзирское и Черёмуховское), так и незаводняемые (Черноозёрское, Южно-Сунчелеевское и Северо-Богемское) нефтяные месторождения.

В обводненных пробах пластовых флюидов (16 проб) была определена численность культивируемых микроорганизмов основных метаболических групп. Показано, что в пластовой воде Черноозёрского, Южно-Сунчелеевского и Северо-Богемского нефтяных месторождений, эксплуатирующихся без применения заводнения, микробное население было очень бедным. Исследованные пробы воды, нагнетаемой в Восточно-Анзирское и Черёмуховское нефтяные месторождения (скважины 1010 и 5600), содержали богатую и разнообразную микробиоту, включающую аэробные органотрофы (≥106 кл/мл) и углеводородокисляющие бактерии (≥105 кл/мл) и анаэробные денитрифицирующие (102 кл/мл) и бродильные (105–106 кл/мл) бактерии. В нескольких пробах пластовой воды из добывающих скважин численность микроорганизмов достигала 106 кл/мл. Наиболее многочисленной была группа бродильных бактерий. Метанобразующие прокариоты, учитываемые в средах с молекулярным водородом и ацетатом, были выявлены в 4-х из 16-ти проб. Сульфатвосстанавливающие бактерии не были выявлены при посеве пластовой воды на среду с лактатом натрия и сульфатом. Образование сероводорода было отмечено только в накопительных культурах бродильных бактерий (из 3-х скважин), полученных в среде с пептоном и глюкозой, после продолжительного культивирования (90 сут.).

Скорость сульфатредукции в пробах пластовых жидкостей из незаводняемых нефтяных пластов варьировала от 0 до 200 нг S2-/(л × сут) и в пробах из заводняемых пластов была на порядок выше (от 108 до 1982 нг S2-/(л × сут)), скорость метаногенеза варьировала от 0 до 1204 нл CH4/(л × сут) и от 24 до 9045 нл CH4/(л × сут), соответственно.

Исследовано филогенетическое разнообразие представителей доменов Bacteria и Archaea в пробе нагнетаемой воды 5600 на основе анализа генов 16S рРНК с использованием методов высокопроизводительного секвенирования. Нагнетаемая вода представляет собой смесь поверхностной воды и пластовой воды, отделенной от нефти. В нагнетаемой воде выявлены как представители поверхностной водной микробиоты, так и микроорганизмы из нефтяного пласта. В результате пиросеквенирования было получено 24925 последовательностей генов 16S рРНК, в том числе, 65 последовательностей архей (0.2%) и 24764 последовательности бактерий (99.0%). Большинство составляли последовательности Proteobacteria (14837 последовательностей), принадлежащие представителям Betaproteobacteria (7998), Alphaproteobacteria (4107), Gammaproteobacteria (2013), Deltaproteobacteria (403) и Epsilonproteobacteria (316). В составе полученной библиотеки выявлены гены 16S рРНК аэробных бактерий родов Acinetobacter, Pseudomonas и Rhodococcus, известных способностью образовывать полезные для нефтевытеснения продукты

(биополимеры и биосурфактанты), а также бактерий рода Dechloromonas, способных расти аэробно или факультативно анаэробно, разрушая ароматические углеводороды (бензол, толуол, ксилол, нафталин) и другие компоненты тяжелой нефти.

Из пластовой воды выделены бактерии родов Acinetobacter, Pseudomonas, Bacillus и Gordonia, образующие биосурфактанты. Обнаруженные в пласте аэробные органотрофные и анаэробные бродильные бактерии накапливали биомассу и продукты неполного окисления нефти (летучие кислоты и спирты), обладающие нефтевытесняющими свойствами.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00028).

FUNCTIONAL AND PHYLOGENETIC DIVERSITY OF MICROORGANISMS IN HEAVY OIL RESERVOIRS

Sokolova D. S., Babich T. L., Semenova E. M., Borzenkov I. A., Turova T. P., Nazina T. N.

Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
Leninsky prospect, 33, build. 2, Moscow, 119071, Russian Federation
e-mail: sokolovadiyana@gmail.com

Physicochemical and microbiological characteristics of formation waters were investigated for several heavy oil reservoirs (Russian Federation). It was revealed that in oilfields exploited without water-flooding microbial populations were scarce, while microbial numbers in water-flooded oilfields were as high as 106 cells/mL. The rate of sulfate reduction and methanogenesis were low. Microbial community composition of formation water samples from heavy oil reservoir were studied by high-throughput sequencing of the 16S rRNA genes. Bacteria of genera Acinetobacter, Pseudomonas, Bacillus and Gordonia were isolated from formation waters. Bacteria of these genera are capable to produce biosurfactants, useful for oil displacement.

Key words: oil reservoirs, heavy oil, microorganisms, 16S rRNA genes, high-throughput sequencing, biogeochemical processes, microbial enhanced oil recovery (MEOR)

In many oil-producing countries, deposits of light conditional oil have already exhausted, so it is important to develop technology of heavy oil (with a density greater than 0.92 g/cm³) recovery. Geological reserves of heavy and high-viscosity oil in Russia reached 6–7 billion tons, but their extraction requires expensive technology, which increases the cost of production. Biological effect on heavy oil is selective for specific reactions, improving its characteristics, and may represent an alternative approach for additional oil recovery. Currently, information on the microorganisms inhabiting of heavy oil reservoirs remains fragmented. The goal of the project is determination of functional and phylogenetic diversity of microorganisms in heavy oil reservoirs to develop a microbial method for enhanced heavy oil recovery.

In heavy oil reservoirs in the Republic of Tatarstan and the Volgograd region were selected 23 samples of formation water and oil. Oil reservoirs are located at depths of 859–1316 m below sea level and have a temperature of 22 to 25 °C. The oil density varied from 0.890 to 1.316 g/cm3 (25 °C), the viscosity – from 198 to 280 mPa×s. Water-flooded oilfields (Vostochno-Anzirskoe and Cheremukhovskoe) and oilfields exploited without water-flooding (Chernoozerskoe, Yuzhno-Suncheleevskoe, and Severo-Bogemskoe) were studied.

In the samples of formation fluids having water phase (16 samples), number of cultured microorganisms belonging to the major metabolic groups were determined. In oilfields exploited without water-flooding, Chernoozerskoe, Yuzhno-Suncheleevskoe and Severo-Bogemskoe oilfields, microbial populations were scarce. The investigated samples of injection water from Vostochno-Anzirskoe and Cheremukhovskoe oil fields (wells 1010 and 5600), contained a rich and diverse microbial populations, including aerobic organotrophic (≥106 cells/ml), and the hydrocarbon-oxidizing bacteria (≥105 cells/ml), and anaerobic denitrifying (102 cells/ml) and fermentative (105–106 cells/ml) bacteria. In some formation water samples from production wells of water-flooded oilfields, microbial numbers were as high as 106 cells/mL. The most numerous group was fermentative bacteria. Methanogenic prokaryotes recorded in media with molecular hydrogen and acetate were detected in 4 of the 16 water samples. Sulfate-reducing bacteria were not detected on a medium with sodium lactate and sulfate. The formation of hydrogen sulfide was observed only in enrichment cultures of fermentative bacteria (3 wells) obtained in the medium with peptone and glucose after long-time cultivation (90 days).

In oil reservoirs exploited without flooding and in water-flooded reservoirs, the rate of sulfate reduction varied

from 0 to 200 ng S2-/(L×day) and from 108 to 1982 ng S2-/(L×day), respectively. Similarly, the rate of methanogenesis varied from 0 to 1204 nL CH4/(L×day) and from 24 to 9045 nL CH4/(L×day) for not flooded and water-flooded oilfields, respectively.

Phylogenetic diversity of Bacteria and Archaea in the sample of injection water (5600 well) was studied by analysis of the 16S rRNA genes with high-throughput sequencing. Injection water represents mixture of surface water and formation water, separated from oil. The results indicated the presence of members of both the surface and oilfield microorganisms in injection water. It was obtained 24925 16S rRNA gene sequences, included 65 archaeal sequences (0.2%) and 24764 bacterial ones (99.0%). Most sequences (14837) belonged to the Proteobacteria, specifically Betaproteobacteria (7998), Alphaproteobacteria (4107), Gammaproteobacteria (2013), Deltaproteobacteria (403), and Epsilonproteobacteria (316). The library of 16S rRNA genes also included sequences of aerobic bacteria Acinetobacter, Pseudomonas and Rhodococcus genera, capable to produce biopolymers and biosurfactants useful for oil displacement. 16S rRNA genes of Dechloromonas were also revealed. This bacterium can utilize aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, xylene, naphthalene) and other components of the heavy oil both aerobically and anaerobically.

Members of genera Acinetobacter, Pseudomonas, Bacillus and Gordonia, capable of biosurfactant production, were isolated from formation waters. Aerobic organotrophic and anaerobic fermentative bacteria, revealed in oil reservoir, form biomass and products of oil degradation (volatile acids and alcohols) having the oil-displacing properties.

This work was supported by Russian Science Foundation, grant no. 16-14-00028.

УДК 574.632

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОТ НЕФТИ

Носков Ю.А.[1], Воробьев Д.С.[1], Туманов М.Д.[2], Никулина Ю.С.[1], Лим А.[1]

[1] Томский государственный университет, Томск, Россия
634050, Томск, пр. Ленина, д. 36
email: yunoskov@gmail.com
[2] Научно-производственный кооператив «Изыскания Мониторинг Кадастр», Сыктывкар, Россия
167000, Сыктывкар, ул. Магистральная, д. 17, кв. 98

Комплексное гидробиологическое обследование нефтезагрязнённого водоёма (озеро Щучье, республика Коми) в 2016 году, через 10 лет после проведения очистки донных отложений от нефти, показало эффективное прохождение процессов восстановления водоёма и увеличение разнообразия гидробионтов.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение; очистка донных отложений.

Нефтяное загрязнение является одним из ведущих факторов антропогенного воздействия на водные экосистемы. Основным путем поступления углеводородов в водоёмы являются аварийные разливы в процессе добычи и транспортировки нефти. Одна из крупнейших аварий произошла в 1994 году в Усинском районе Республики Коми, при которой произошла утечка более 200 тыс. тонн нефтесодержащей жидкости. Помимо территорий покрытых нефтью земель, загрязнёнными оказались множество рек и озёр. Через несколько лет после аварии в районе загрязнения стала отмечаться рыба с отклонениями в строении тела. Наиболее часто описывалась щука (Esox lucius) со значительно укороченной верхней челюстью. Специалистами Томского государственного университета и Научно-технического объединения «Приборсервис», г. Томск, по заказу ООО «ЛУКОЙЛ-Коми», была разработана технология очистки воды и донных отложений от нефти. В 2004–2005 гг. проводилось её экспериментальное испытание на озере Щучье, площадью 6,4 га. В результате проведенных очистных работ содержание нефти в донных отложениях снизилось более чем в 20 раз. Было отмечено появление бентосных организмов и увеличение численности, биомассы и количества видов зоопланктона, увеличение линейных показателей и темпов роста рыб.

В июле 2016 г., спустя 10 лет после проведения очистных мероприятий, были проведены комплексные гидробиологические исследования оз. Щучье и фонового оз. Безымянное, не подвергавшегося загрязнению. Химический анализ проб донных отложений и воды показал значительное снижение концентрации нефтепродуктов относительно уровня 2005 г. – концентрация нефти в донных отложениях оз. Щучье лишь

в одной точке отбора составляла около 5 г/кг, в остальных пробах не превышала 3 г/кг. Концентрация нефтепродуктов в воде не превышала значений предельно допустимых концентраций. Видовой состав зоопланктона оз. Щучье отличался большим разнообразием по сравнению с оз. Безымянным, однако численность зоопланктона в первом озере была значительно ниже. Донные ценозы озера Щучье были представлены детритно-илистыми отложениями. В 2005 году абсолютными доминантами в бентосе были олигохеты, в 2016 году доминирование перешло к личинкам хирономид. Видовой состав ихтиофауны исследованных озёр был аналогичен и включал три вида – плотва, окунь и щука. Результаты биологического анализа рыб двух озёр не выявили достоверных различий между ними. В уловах был встречен всего один экземпляр щуки с деформированным челюстным аппаратом. Возраст данного экземпляра составлял 11+ лет. При анализе микроэлементного состава тканей (мышц) рыб из двух озер было обнаружено превышение допустимых остаточных количеств для 5 из 15 элементов: Al, Cr, Fe, Cu, Zn. Сравнивая содержание микроэлементного состава у рыб следует отметить, что превышение допустимых остаточных количеств некоторых элементов было характерно для обоих исследованных озёр.

Полученные результаты исследований: видовое сходство фитопланктона, зоопланктона, отсутствие щуки с отклонениями в развитии челюстного аппарата, являются показателем благоприятных условий для существования гидробионтов в озере Щучье. Проведенные исследования свидетельствуют о высокой эффективности технологии очистки донных отложений от нефти.

Исследование было выполнено при поддержке Гранта Президента Российской Федерации № МК-5336.2016.4.

THE EFFECTIVENESS OF TECHNOLOGY FOR CLEANING UP OIL FROM BOTTOM DEPOSITS

Noskov Y.A.[1], Vorobiev D.S. [1], Tumanov M.D. [2], Nikulina Y.S. [1], Lim A.G. [1]

[1] Tomsk State University, Tomsk, Russia
634050, Tomsk, Lenina av., 36
email: yunoskov@gmail.com
[2] Scientific-Production Cooperative «Researches Monitoring Inventory», Syktyvkar, Russia
167000, Syktyvkar, Magistralnaya str., 17-98.

A complex hydrobiological survey of an oil-contaminated water body (Lake Shchuchye in the Komi Republic) conducted in 2016, after ten years of cleaning up oil from the bottom deposits, has shown effective recovery processes in the water and an increase in the diversity of hydrobionts.

Key words: oil contamination; cleaning up of bottom deposits.

Oil contamination is one of the most influential anthropogenic factors on water ecosystems. The main entry path of hydrocarbons into water bodies is emergency spills during the extraction process and oil transportation. One of the most significant incidents occurred in 1994 in the Usinsk district of the Komi Republic, during which there was a leak of more than 200,000 tonnes of oil-containing liquid. Besides the areas covered with oil, a large number of rivers and lakes was also contaminated. Several years after the incident, fish were recorded in the district with deviations in their body structure. Most frequently pike (Esox lucius) with a significantly shortened upper jaw was described. Technology for cleaning water and bottom deposits was developed by specialists at Tomsk State University and the Priborservis Scientific and Technical Association (Tomsk), commissioned by LUKOIL-Komi LLC. In 2004-2005 experimental testing of the technology took place on Lake Shchuchye with an area of 6.4 hectares. As the result of the cleaning up, the containment of oil in the bottom deposits decreased by more than 20 times. Emergence of benthic organisms, an increase in biomass and in the number of zooplankton species, and an increase in the linear parameters and the rate of fish growth were recorded.

In July 2016, ten years after the purification, complex hydrobiological surveys were conducted of Lake Shchuchye along with Lake Bezimyannoe, which had not been subject to contamination. Chemical analysis of samples of water and bottom deposits showed a significant decrease in the concentration of petroleum products relative to the level of 2005 – the oil concentration in the bottom deposits of Lake Shchuchye at only one point of extraction was about 5g/kg, and the other samples did not exceed 3g/kg. The concentration of petroleum products in the water did not exceed the maximum permissible concentrations. The species composition of the zooplankton

of Lake Shchuchye is more diverse in comparison with Lake Bezimyannoe, but the number of zooplankton in the former was significantly lower. The bottom cenoses of Lake Shchuchye were made up of detrital-silt deposits. In 2005 oligochaetes were the absolute dominants in the benthos; in 2016 the dominance was obtained by the larvae of chironomids. The species composition of the fish fauna in the lakes was similar and included three species – roach, perch and pike. The results of biological analysis of fish in the two lakes did not reveal any reliable difference between them. In the catches only one example of a pike with a deformed jaw was recorded. The age of this fish was 11+ years. During analysis of the microelement composition of tissues (muscles) of fish from the two lakes an excess of allowable residual amounting to 5 out of 15 elements was found: Al, Cr, Fe, Cu, Zn. Comparing the content of microelement composition it is important to note that the excess of allowable residual amounts of some elements was typical for both of the surveyed lakes.

The following results were obtained: similarity in phytoplankton species and zooplankton species; the absence of pike with deviations in jaw development are indicators of conditions conducive to the existence of hydrobionts in Lake Shchuchye. The surveys demonstrate the high effectiveness of the oil cleaning up technology.

The research was supported by the grant of President of Russian Federation № MK-5336.2016.4.

УДК 574.632

ВОДНЫЕ ЧЕРВИ В НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ИЛАХ

Воробьев Д.С., Воробьев Е.Д.

Биологический институт Томского государственного университета, Томск, Россия
634050, Россия, Томск, пр. Ленина, 36
e-mail: danilvorobiev@yandex.ru

В результате экспериментов с водными червями семейства Tubificidae (Limnodrilus hoffmeisteri Claparede, 1862) в нефтезагрязненных донных отложениях достоверно выявлено, что содержание свежей нефти в илах в концентрации 2 г/кг является порогом толерантности червей при их перемещении из чистых участков дна в загрязненные.

Ключевые слова: водные черви; донные отложения; ил; нефтяное загрязнение.

Нефть является одним из основных загрязнителей водных экосистем, особенно в бассейне реки Обь, где идет активная добыча углеводородного сырья [1]. Водные малощетинковые черви устойчивы к нефтяному загрязнению и активно участвуют в процессах биологической деструкции нефти в донных отложениях [2, 3]. Целью исследования являлось определение нижнего порога чувствительности Limnodrilus hoffmeisteri к загрязнению иловых отложений свежей нефтью.

Для проведения экспериментов были изготовлены стеклянные аквариумы с размерами 20x10x1 см. В левую часть аквариума помещали чистый ил, в правую – загрязненный нефтью. После заливки воды 100 взрослых червей помещались в область чистого ила (вблизи границы чистого и загрязненного ила) (Рис. 1). Температура воды 21…22 ºС; аэрация не проводилась. Длительность каждого эксперимента – 7 суток. Ежесуточно проводился подсчет червей в левой и правой частях аквариума (Рис. 2). Всего было проведено 10 серий экспериментов с концентрациями нефти: 100, 50, 25, 15, 10, 7, 5, 3, 2 г/кг и без нефти (контроль).

В результате экспериментов доказано, что при концентрации свежей нефти 2 г/кг и ниже не выявлено достоверных отличий по ежесуточному количеству червей между чистыми и загрязненными участками. Благодаря процессам биотурбации в донных отложениях, вызванных деятельностью червей, происходят изменения состава и свойств донных отложений. Использование данного процесса для очистки донных отложений весьма перспективно и требует изучения.

Литература:

1. *\Vorobiev D.S. Noskov Y.A. Oil Contamination of the Ob Basin // International Journal of Environmental Studies. 2015. Vol. 72. Issue 3. P. 509-515.*
2. *Vorob'ev, D.S., Frank, Y.A., Lushnikov, S.V., Zaloznyi, N.A., Noskov, Y.A. Oil decontamination of bottom sediments using Limnodrilus hoffmeisteri (Oligochaeta: Tubificidae) // Contemporary Problems of Ecology. 2010. Vol. 3(1). P. 15-18.*
3. *Патент РФ № 2357929, 26.06.2007.*

Рисунок 1. Посадка червей в экспериментальные аквариумы.

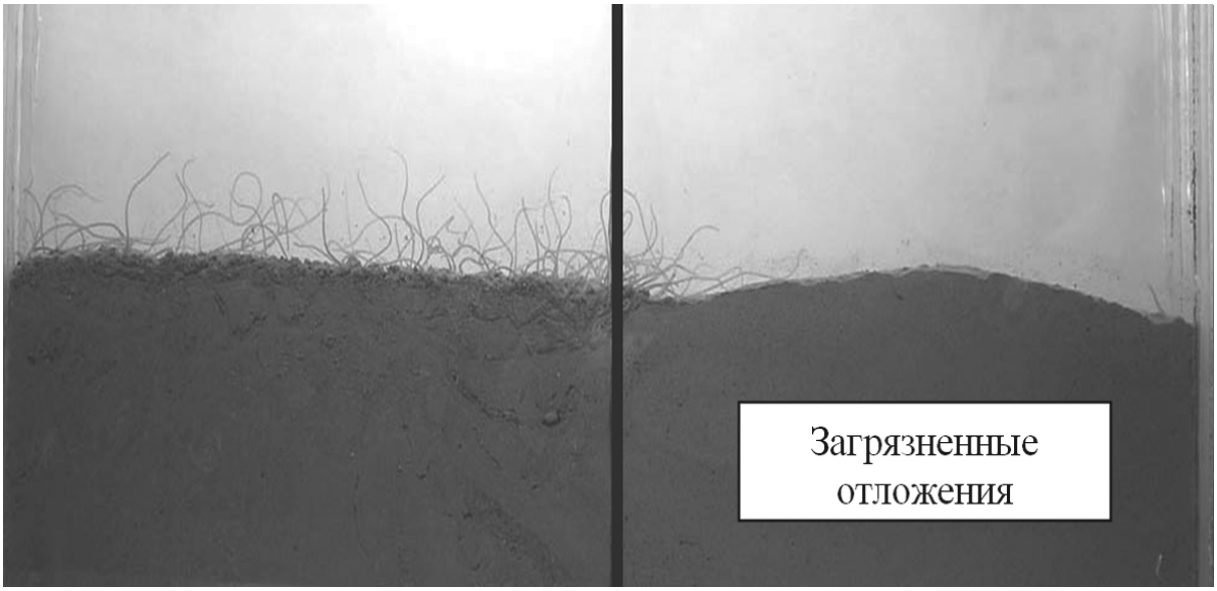


Рисунок 2. Распределение червей в аквариуме на 3-е сутки при концентрации нефти в правой (загрязненной) части аквариума 10 г/кг.

AQUATIC OLIGOCHAETES IN OIL-CONTAMINATED SILT

Vorobiev D.S., Vorobiev E.D.

Institute of Biology, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia
634050, Russia, Tomsk, Lenina Ave., 36
e-mail: danilvorobiev@yandex.ru

As the result of experiments with aquatic oligochaetes of the Tubificidae (Limnodrilus hoffmeisteri Claparede, 1862) family in oil-contaminated bottom deposits, it was reliably established that a fresh oil content in silts in the concentration of 2 g/kg is the tolerance threshold for worms when moving them from the clean parts of the bottom sediments to contaminated parts.

Key words: aquatic oligochaetes; bottom deposits; silt; oil contamination.

Oil is one of the major pollutants of water ecosystems, especially in the catchment area of the Ob River, where active extraction of hydrocarbon raw materials is in process [1]. Aquatic oligochaetes are resistant to oil contamination and participate actively in the processes of the biological destruction of oil in bottom deposits [2, 3]. The goal of the research was to reveal the lower sensitivity threshold of Limnodrilus hoffmeisteri to oil contamination in silt deposits.

A glass aquariums with dimensions of 20x10x1 cm was made for the experiment. In the left part of the aquarium clean silt was placed; the right part contained contaminated silt. After filling the aquariums with water, 100 full-grown aquatic oligochaetes were placed into the area of clean silt (close to the border of clean and contaminated silt) (Fig.1). The temperature of the water was 21-22 ºC; aeration was not carried out. The duration of each experiment was 7 days. Counting of aquatic oligochaetes in the left and right parts of the aquarium was conducted daily (Fig.2). In total, 10 series of experiments were conducted with oil concentrations of 100, 50, 25, 15, 10, 7, 5, 3, 2 g/kg and without oil (as a control test).

The experiments demonstrated that at a 2 g/kg oil concentration and lower there are no reliable differences between the clean and contaminated areas in terms of the daily number of aquatic oligochaetes. Due to the bioturbation processes caused by the aquatic oligochaetes, changes of composition and properties of the bottom deposits occur in the bottom deposits. The use of this process for purification of bottom deposits is particularly promising and requires further research.

Fig 1. Placement of aquatic oligochaetes into the experimental aquariums

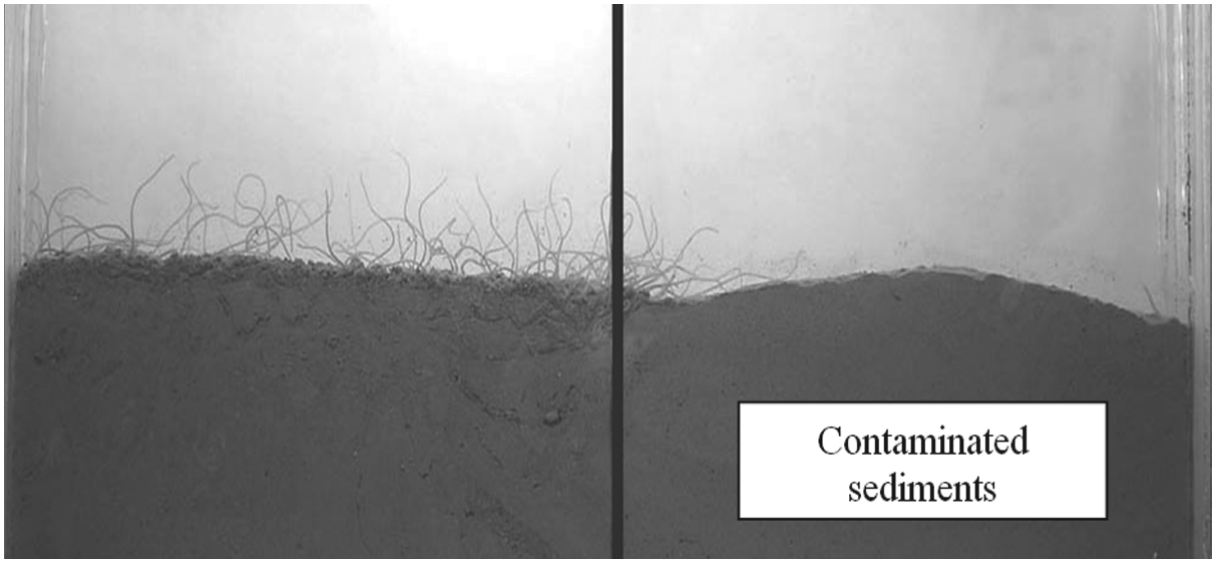


Fig 2. Distribution of aquatic oligochaetes in the aquarium on the third day with an oil concentration of 10 g/kg in the right (contaminated) part of the aquarium

References:
1. *Vorobiev D.S. Noskov Y.A. Oil Contamination of the Ob Basin // International Journal of Environmental Studies. 2015. Vol. 72. Issue 3. P. 509-515.*
2. *Vorob'ev, D.S., Frank, Y.A., Lushnikov, S.V., Zaloznyi, N.A., Noskov, Y.A. Oil decontamination of bottom sediments using Limnodrilus hoffmeisteri (Oligochaeta: Tubificidae) // Contemporary Problems of Ecology. 2010. Vol. 3(1). P. 15-18.*
3. *Patent of the Russian Federation № 2357929, 26.06.2007.*

УДК 628.35

О ПРЕИМУЩЕСТВАХ ГЕТЕРОГЕННОСТИ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Сироткин А.С., Вдовина Т.В., Кобелева Й.В.

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, Россия
420015, Казань, ул. Карла Маркса, д. 68
e-mail: asirotkin66@gmail.com

Показано, что реализация современных тенденций к созданию эффективных систем водоочистки основана на технологиях, использующих гетерогенность и стратифицированность микробных сообществ

Ключевые слова: микробиоценоз, пространственная сукцессия

По результатам анализа литературы и результатов собственных экспериментальных исследований показано, что эффективная биологическая очистка сточных вод с комплексным удалением примесей основана на деятельности различных групп микроорганизмов, использующих различные субстраты и нередко требующих принципиально различных условий культивирования в одном сооружении. Результаты анализа информации о пространственном распределении автотрофных и гетеротрофных микроорганизмов, аэробов, микроаэрофилов и облигатных анаэробов in situ в составе единого микробиоценоза системы биологической очистки [1,2], а также метаболической активности микроорганизмов биоценоза в условиях их культивирования ex situ на селективных средах [3] свидетельствуют о значительном потенциале гетерогенных микробных агрегатов для использования в технологиях биологической очистки сточных вод.

Литература:
1. *Кирилина Т.В., Сироткин А.С., Денеке М. Пространственное распределение азоттрансформирующих микроорганизмов в процессе биофильтрации сточных вод // Вода: химия и экология. – 2012. – № 5. – С. 60-65.*
2. *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. 85-95.*
3. *Литти Ю.В., Некрасова В.К., Куликов Н.И., Симанькова М.В., Ножевникова А.Н. Обнаружение анаэробных процессов и микроорганизмов в иммобилизованном активном иле станции очистки сточных вод с интенсивной аэрацией // Микробиология. – 2013. – Т. 82(№ 6) – С. 672-680.*

THE BENEFITS OF HETEROGENEITY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN BIOTECHNOLOGIES OF WASTE WATER TREATMENT

Sirotkin A.S., Vdovina T.V., Kobeleva Y.V.

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia
420015, Kazan, Karl Marx Str. 68
e-mail: asirotkin66@gmail.com

It is shown that the implementation of modern trends for effective systems of waste water treatment is based on using the heterogeneity and stratification of the microbial communities

Key words: microbiocenosis, spatial succession

According to the analysis of literature and the results of own experimental research it have shown that an effective biological waste water treatment with the complex removal of components from waste water is based on the activities

of the various groups of microorganisms using a variety of substrates, and often require a fundamentally different culture conditions in one installation (bioreactor). The results of the analysis of the spatial distribution of autotrophic and heterotrophic microorganisms, aerobes and obligate anaerobes, microaerophilic in situ within a microbiocenosis in biological treatment system [1,2] as well as metabolic activity biocenosis microorganisms in the conditions of ex situ cultivation on selective media [3] show significant potential of heterogeneous microbial aggregates for use in biological wastewater treatment technologies.

References:
1. Kirilina T.V., Sirotkin A.S. and Denecke M. Spatial distribution of nitrogen-transforming microorganisms in the wastewater biofiltration // Water: chemistry and ecology. – 2012. – № 5. – P. 60-65.
2. Kirilina T.V. Bioconversion of nitrogen and phosphorus in the wastewater biofiltration and after-treatment by submerged macrophytes: Dissertation .... PhD. – Kazan, 2011. – P. 85-95.
3. Litti J.V., Nekrasova V.K., Kulikov N.I., Simankova M.V. and Nozhevnikova A.N. Detection of anaerobic processes and microorganisms in the immobilized activated sludge wastewater treatment plant with intensive aeration // Microbiology. – 2013. – V. 82 (№ 6) – P. 672-680.

УДК 602-7

РАЗРАБОТКА И ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ МИКРОБНОГО БИОФИЛЬТРА ДЛЯ ОЧИСТКИ ЛИВНЕВЫХ ВОД ХИМИЧЕСКИ ОПАСНЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Жариков Г.А., Марченко А.И, Крайнова О.А.

Научно-исследовательский Центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина 102А, тел/факс (4967) 39–97–38, zharikov@toxicbio.ru

Разработан и испытан проточный микробный биофильтр для очистки ливневых вод химически опасных производств.

Ключевые слова: ливневые воды, биофильтр, микроорганизмы-деструкторы токсичных химических веществ и нефтепродуктов.

Разработан проточный биофильтр, встраиваемый в существующую систему ливневой канализации предприятия, позволяющий проводить очистку ливневых вод от загрязняющих веществ с использованием иммобилизованных микроорганизмов-деструкторов. Биофильтр устанавливается внутрь трубы. На его каркас натянута сорбционная ткань, на которую наносят биомассу микроорганизмов-деструкторов промышленных загрязнителей, от которых хотят очистить воду. В НИЦ ТБП организован музей живых культур микроорганизмов, разлагающих различные токсичные химические вещества (нефтепродукты, масла, полихлорированные бифенилы, ракетное топливо – гептил, этиленгликоль, авиационный керосин, пестициды, хлорорганические и фосфорорганические соединения...). Микроорганизмы проверены на безопасность на базе виварного комплекса НИЦ ТБП на лабораторных животных (белых мышах и крысах).

Опытные образцы биофильтров успешно прошли опытно-промышленные испытания на базе аэродрома «Домодедово», в г. Серпухове и п. Оболенск Московской области. При прохождении ливневой воды через биофильтр, загрязняющие химические вещества сорбируются на ткани и разлагаются микроорганизмами-деструкторами. При этом вода становится не токсичной.

Таким образом, разработана технология очистки ливневых вод от токсичных химических веществ, при помощи микроорганизмов-деструкторов. Биофильтры оригинальной конструкции устанавливаются непосредственно в трубы ливневой канализации, не оказывают значительного сопротивления току воды и обладают высокой эффективностью по очистке от загрязнителей.

DEVELOPMENT OF MICROBIAL BIOFILTER FOR TREATMENT OF HAZARDOUS CHEMICALS FACILITIES STORM WASTEWATER

Zharikov G.A., Marchenko A.I., Krainova O.A.

Research center for toxicology and hygienic regulation of biopreparations – affiliated Institution at National research center – Institute of immunology of Federal Medical-biological agency of Russia, 142253, Lenin str., 102A, Serpukhov, Moscow region, Tel/fax +7 (4967) 39-97-38, zharikov@toxicbio.ru

Microbial biofilter to be installed into storm drainage pipe for treatment of storm wastewater from hazardous chemicals facilities was developed and tested.

Key words: storm wastewater, biofilter, microorganisms – destructors of toxicants.

A compact biofilter to be installed into existing storm drainage system of a facility was developed. The filter allows for treatment of storm wastewater from polluting substances with the help of immobilized microorganisms – destructors. The biofilter is inserted inside a pipe. Sorption material is stretched over the biofilter's frame. Biomass of microorganisms destructing industrial pollutants is applied onto the sorption material. At RCT&HRB there is a museum of living cultures of microorganisms, destructing different toxic chemicals (oil products, oils, polychlorinated biphenyls, ethylene glycol, chlor-organic compounds and organophosphorous compounds…). The microorganisms were tested for their safety on laboratory animals (white mice and rats) at RCT&HRB vivarium.

Trial biofilters were successfully tested during pilot-testing at the premises of Domodedovo airport. Destruction of pollutants in storm water was assessed by results of chemical analisys and biotesting for integral toxicity.

Thus, storm wastewater treatment technology with the help of microorganisms – destructors applied onto the filter sorption material was developed. Uniquely designed biofilters are installed directly into storm drainage pipes, they do not considerably resist the water flow and have high pollutant-degrading potential.

УДК 579. 68

ПРОНИЦАЕМЫЙ БИОГЕОХИМИЧЕСКИЙ БАРЬЕР В ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТАХ ДЛЯ ХРАНИЛИЩ РАДИОАКТИВНЫХ ОТХОДОВ

Бабич Т. Л.[1], Назина Т.Н.[1], Иванов П.В.[3], Андрющенко Н.Д.[2], Сафонов А.В.[2], Захарова Е.В.[2], Степанюк И.М.[1]

[1] Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, 33, корп. 2
[2] Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр-кт, д. 31, корп. 4
[3] Институт Геологии Йенского университета им. Ф. Шиллера, Йен, Германия Burgweg 11, 07749 Jena, Germany
email: microb101@yandex.ru

Исследована возможность использования ряда природных материалов, а также биологических процессов для создания проницаемого противомиграционного барьера на пути тока подземных вод, загрязненных нитратами, радионуклидами и тяжелыми металлами в районах консервации хранилищ жидких радиоактивных отходов.

Ключевые слова: радиоактивные отходы, законсервированные хранилища РАО, биогеохимический барьер, микроорганизмы, радионуклиды, нитраты, органотрофные и денитрифицирующие бактерии.

В районах расположения действующих и законсервированных хранилищ радиоактивных отходов (РАО) в настоящее время в соответствии с требованиями МАГАТЭ необходимо сооружение многоступенчатой барьерной системы безопасности. Актуальной является разработка новых более надежных и экономически целесообразных систем защитных барьеров с учетом многокомпонентного состава РАО. Одним из перспективных направлений является использование биогеохимического барьера, действие которого основано на сорбционных свойствах доступных природных минералов по отношению к тяжелым металлам (Cd, Cr) и радионуклидам (U, Tc, Pu), и способности микроорганизмов восстанавливать переменновалентные металлы до маломобильных форм, нитрат-ионы до молекулярного азота и окислять органические соединения до углекислого газа.

В ходе работы были изучены физико-химические характеристики таких природных материалов, как цеолит, шунгит, перлит, вермикулит и их модификации, с целью использования их в качестве сорбирующего компонента биогеохимического барьера. Получены коэффициенты распределения (Kd) и скорость десорбции радионуклидов на данных материалах, влияние их сорбционных характеристик на компоненты природных вод, загрязненных РАО. Выявлена высокая эффективность шунгита в качестве сорбента для технеция и цеолита для удаления урана.

Для биологического компонента проницаемого барьера из образцов пластовых вод, отобранных в

районе законсервированного хранилища жидких РАО Сибирского химического комбината (г. Северск, Томская обл.), были выделены чистые культуры аэробных органотрофных и денитрифицирующих бактерий родов Pseudomonas, Bacillus, Shewanella, Cupriavidus, Microbacterium, Rhodococcus, Rhizobium, Ensifer, Thermomonas. Выявлена способность этих бактерий не только восстанавливать нитраты, но и уменьшать окислительно-восстановительный потенциал среды (с +120-150 до -60-80 mv), тем самым снижая степень окисления, а, следовательно, и растворимость урана и других радионуклидов и способствуя их иммобилизации. Наилучшие результаты показали бактерии, принадлежащие видам Microbacterium oxydans штамм SHC-3-5 и Thermomonas fusca штамм SHC-3-19.

На примере бактерий рода Shewanella (Shewanella xiamenensis штамм ДСВ-2-1) определена совместимость микроорганизмов с исследованными сорбентами (цеолитом, шунгитом, перлитом, вермикулитом) и оценена способность микроорганизмов образовывать стабильные биопленки на поверхности этих минералов при добавлении в качестве органического субстрата ацетата натрия и молочной сыворотки. Выявлено, что бактериальные пленки лучше всего образовывались на цеолите и перлите (при добавлении ацетата и молочной сыворотки) и вермикулите (при добавлении молочной сыворотки).

Полученные результаты позволяют определить максимально подходящий природный сорбент и предложить бактериальные штаммы для создания биогеохимического барьера в рамках разработки современных биотехнологических способов очистки подземных вод.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований проекта 16-03-00153.

PERMEABLE BIOGEOCHEMICAL BARRIER IN AQUIFERS FOR STORAGE OF RADIOACTIVE WASTES

Babich T.L.[1], Nazina T.N.[1], Ivanov P.V.[3], Andrushenko N.D.[2], Safonov A.V.[2], Zakharova E.V.[2], Stepanyuk I.M.[1]

[1] Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
117312, Moscow, Prospekt 60-years of October, 7, build. 2
[2] Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninsky Prospect, 31, build. 4
[3] Friedrich Schiller University Jena Institute of Geosciences, Germany
Burgweg 11, 07749 Jena, Germany
email: microb101@yandex.ru

The paper discusses the usability of a range of natural materials, as well as biochemical processes, to create the permeable anti-migration barrier in the way of nitrates-, radionuclides- and heavy metals-contaminated groundwater flow in the area of conservation of liquid radioactive waste storages.

Key words: radioactive wastes, conserved RW storages, biogeochemical barrier, microorganisms, radionuclides, nitrates, organotrophic and denitrifying bacteria.

Nowadays International Atomic Energy Agency's (IAEA) regulations require the construction of the multistep barrier safety systems in the areas of active and conserved radioactive wastes (RW) storages. The designing of new more reliable and economically reasonable barrier systems taking into account multicomponent composition of the RW is of a great concern. The usage of biogeochemical barrier seems quite perspective. Its performance is based on the absortivity of some common natural materials to trace toxic metals (Cd, Cr) and radionuclides (U, Tc, Pu), as well as the capability of the microorganisms to reduce ambivalent metals into limited mobility forms; nitrates into molecular nitrogen and to oxidize organic compounds to carbon dioxide.

In this investigation we studied the physical-chemical characteristics of zeolite, shungite, perlite, vermiculite and their modifications, aiming to show their usability as sorbing component of biogeochemical barrier. The partition coefficients (Kd) and radionuclides' desorption speeds were obtained for these materials. The influence of their sorbing characteristics on components of natural waters, polluted with RW, was shown. The high efficiencies of Technetium sorption on shungite and Uranium sorption on zeolite were discovered.

For biotic component of the barrier pure cultures of organotrophic and denitrifying microorganisms were obtained from the groundwater sampled in the area of conserved liquid RW storage of the Siberian chemical plant (Seversk, Tomsk region). The strains were of the gen. Pseudomonas, Bacillus, Shewanella, Cupriavidus, Microbacterium, Rhodococcus, Rhizobium, Ensifer, Thermomonas. We showed that these bacteria were capable

not only of reduction of nitrates, but also of changing the redox potential of the media (from +120-150 to -60-80 mv), resulting in the decrease of the oxidation state of Uranium and other radionuclides, and, consequently, their solubility, promoting their immobilization. The best results were obtained for the strains Microbacterium oxydans SHC-3-5 and Thermomonas fusca SHC-3-19.

Using bacteria of gen. Shewanella (Shewanella xiamenensis DCB-2-1), we assessed the compatibility of microorganisms with investigated sorbents (zeolite, schungite, perlite and vermiculite), as well as the capability of bacteria to form consistent biofilms on the surfaces of these minerals when sodium acetate and milk serum whey were added as organic substrate. The experiments showed that biofilm formation was more sufficient on zeolite and perlite (when sodium acetate and milk serum whey were added) and vermiculite (when only milk serum whey was added).

The obtained results allow to choose the most relevant natural sorbent and to propose the utilisation of bacteria strains to design biogeochemical barrier as modern approach to the groundwater purification.

The investigation was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project Nr. 16-03-00153.

УДК: 579.222.2

ДЕСТРУКЦИЯ ПЕРСИСТЕНТНЫХ ПОЛЛЮТАНОТОВ ЛИГНИНОЛИТИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ

Позднякова Н.Н., Дубровская Е.В., Баландина С.А., Голубев С.Н., Крючкова Е.В., Гринев В.С, Сигида Е.Н., Турковская О.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия
410049, Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13
e-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru

На основании скрининга 20 штаммов базидио- и аскомицетов на деструктивную активность по отношению к ПАУ, НПАВ, алкилфенолам, синтетическим красителям и нефти выявлены штаммы грибов, обладающие комплексом свойств, перспективных для их эффективного использования в экобиотехнологиях.
Ключевые слова: базидио- и аскомицеты; микоремедиация, метаболизм персистентных поллютантов; лигнинолитические ферменты.

В последние годы биоремедиация стала важным, а в некоторых случаях основным инструментом восстановления загрязненных объектов. Наиболее активными деструкторами поллютантов являются микроорганизмы, обладающие мощнейшим метаболическим потенциалом и способные минерализовать практически любое органическое вещество. В настоящее время на рынке для осуществления биоремедиации предлагаются, в основном, бактериальные препараты. Вместе с тем, грибы обладают не меньшим, а возможно, и большим детоксикационным потенциалом в отношении персистентных поллютантов. Однако из-за недостаточной изученности этих организмов в приложении к экологическим биотехнологиям их применение ограничено.

Проведен первичный скрининг 20 штаммов лигнинолитических грибов из различных коллекций по деградативной активности в отношении ряда наиболее опасных и распространенных персистентных поллютантов, включая полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), оксиэтилированный нонилфенол (неонол АФ9-12), алкилфенол (изононилфенол), синтетические красители антрахинонового типа (Acid Blue 62 и Reactive Blue) и нефть.

Обнаружено, что все изученные базидиомицеты активно деградировали ПАУ (антрацен, фенантрен, флуорен), о чем свидетельствовало снижение их концентрации в среде культивирования. Деградация этих веществ варьировала от 16 до 100%. Наиболее активными деструкторами оказались базидиомицеты Pleurotus ostreatus MUT2977, Pleurotus ostreatus D1, Lenzites betulina, Trametes versicolor MUT3403, Trametes maxima и аскомицет Cladosporium herbarum. Установлено, что, несмотря на некоторые различия, деградация ПАУ происходит по одной схеме с образованием хиноновых метаболитов на первом этапе: 9,10-антрахинона в случае антрацена, 9-флуоренона – флуорена, фенантрен-9,10-хинона – фенантрена. Получены данные, подтверждающие, что «глубина» деградации исследованных ПАУ может определяться составом внеклеточного лигнинолитического комплекса.

Антрахинон занимает центральную часть молекул синтетических красителей, так называемого, антрахинонового типа, в связи с чем, они проявляют высокую устойчивость к биодеградации. Обнаружено, что все исследованные базидиомицеты и аскомицет C. herbarum полностью обесцвечивали Acid Blue 62 и Reactive Blue 4, при этом для грибной деградации были доступными как хромофорная часть молекулы, так и ароматическое кольцо.

Биоразложение неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ), в том числе оксиэтилированных алкилфенолов, происходит с большим трудом, приводя зачастую к образованию устойчивых и токсичных алкилфенолов в качестве конечных метаболитов. Показано, что базидиомицеты Pleurotus ostreatus f. Florida, P. ostreatus MUT, P. ostreatus 336, P. ostreatus LE-BIN, Bjerkandera adusta, Schizophyllum commune и аскомицет C. herbarum атаковали оксиэтильную цепочку, тогда как ароматическое кольцо оставалось интактным. Деградация неонола Stropharia rugosoannulata и Trametes ochracea затрагивала только ароматическое кольцо. И, наконец, еще 9 видов грибов разрушали и ту и другую части молекулы неонола, наибольшая активность при этом выявлена у базидиомицета Trametes gibbosa и аскомицета Geotrichum candidum.

Алкилфенолы, в частности, изононилфенол, являются продуктами неполной деградации оксиэтилированных алкилфенолов. Для большинства исследованных грибов изононилфенол оказался токсичным и его деградация обнаружена только у 5 видов базидиомицетов (T. versicolor MUT, Len. betulina, P.ostreatus f. Florida, Str. rugosoannulata, Sch. commune) и одного аскомицета (C. herbarum). Наиболее активным деструктором был Sch. commune, убыль составила 61%.

В результате природных процессов и хозяйственной деятельности человека в окружающую среду попадают сложные смеси поллютантов, в том числе нефть. Обнаружено, что большинство исследованных деревообитающих базидиомицетов активно утилизировали нефть, при этом убыль составляла от 72 до 92%. Наиболее активными были представители родов Pleurotus и Trametes. Подстилочный сапротроф Str. rugosoannulata деградировал до 90% нефти. Исследованные аскомицеты, за исключением G. candidum, также были активными деструкторами нефти, убыль составила от 60 до 84%.

На основании проведенного скрининга по совокупности деградативных свойств, адаптационного потенциала и продукции лигнинолитических ферментов, определены штаммы грибов, перспективные для их эффективного использования в экобиотехнологиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00081).

UDC: 579.222.2

DEGRADATION OF PERSISTENT POLLUTANTS BY LIGNINOLYTIC FUNGI

Pozdnyakova N., Dubrovskaya E., Balandina S., Golubev S., Kryuchkova Ye., Grinev V., Sigida E., Turkovskaya O.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia.
13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049,
e-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru

Screening of 20 strains of basidio- and ascomycetes for their degradative activity toward PAHs, nonionic surfactants, alkyl phenols, synthetic dyes, and oil permitted us to select the most active fungi which hold promise for further studies and for use in biotechnology.

Key words: basidio- and ascomycetes; mycoremediation; metabolism of persistent pollutants; ligninolytic enzymes.

Today, bioremediation is an important and, in some cases, the main instrument of decontamination of polluted areas. The principal agents of decontamination of nature from pollutants are microorganisms, which have strong metabolic potential and can mineralize almost all organic compounds. The preparations currently marketed for the bioremediation of polluted sites are mostly bacteria-based. Although fungi have strong detoxication potential toward persistent pollutants, they have been insufficiently studied and their use in ecological biotechnologies is limited.

We screened 20 strains of ligninolytic fungi from different collections for their degradative activity toward some of the most hazardous, widespread, and persistent pollutants. These pollutants included polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nonionic detergents (neonol AF9-12), alkylphenol (isononyl phenol), anthraquinonic synthetic dyes (Acid Blue 62 and Reactive Blue), and oil.

All the basidiomycetes examined were active in degrading the PAHs (anthracene, phenanthrene, and fluorene), as evidenced by the decreased concentrations of these pollutants in the cultivation medium. Anthracene, phenanthrene, and fluorene were degraded by 16 to 100%. The most active degraders were the basidiomycetes Pleurotus ostreatus MUT, Pleurotus ostreatus D1, Lenzites betulina, Trametes versicolor MUT, and Trametes maxima, as well as the ascomycete Cladosporium herbarum. Despite some differences, the degradation of the three PAHs followed the same scheme, forming quinone metabolites at the first stage: 9,10-anthraquinone with

anthracene, 9-fluorenone with fluorene, and phenanthrene-9,10-quinone with phenanthrene. Data were obtained to support our hypothesis that the degree of PAH degradation may depend on the composition of the extracellular ligninolytic complex.

Anthraquinone occupies the central part of the molecules of a wide range of synthetic dyes called anthraquinone-type dyes, which are highly resistant to biodegradation. All the basidiomycetes examined and the ascomycete C. herbarum decolorized Acid Blue 62 and Reactive Blue 4 completely. Both chromophoric part of the molecules and aromatic ring were available for fungal degradation.

Nonionic surfactants, including oxyethylated alkylphenols, are difficult to degrade, yielding persistent and toxic alkylphenols as the final metabolites. The basidiomycetes Pleurotus ostreatus f. Florida, P. ostreatus MUT, P. ostreatus 336, P. ostreatus LE-BIN, Bjerkandera adusta, and Schizophyllum commune, as well as the ascomycete C. herbarum, attacked the oxyethyl chain, whereas the aromatic ring was intact. The degradation of neonol by Stropharia rugosoannulata and Trametes ochracea affected only the aromatic ring. The other nine fungal strains degraded both portions of the neonol molecule. The basidiomycete Trametes gibbosa and the ascomycete Geotrichum candidum were the most active.

Alkylphenols, in particular isononyl phenol, result from incomplete degradation of oxyethylated alkylphenols. Isononyl phenol was toxic to most of the fungi examined by us and was degraded only by five basidiomycetes (T. versicolor MUT, Len. betulina, P. ostreatus f. Florida, Str. rugosoannulata, and Sch. commune) and one ascomycete (C. herbarum). Sch. commune was the most active decomposer, decreasing the content of isononyl phenol by 61%.

Natural processes and the economic activities of humans contaminate the environment with complex pollutant mixtures, including oil. Most of the wood-inhabiting basidiomycetes in this study actively degraded oil; the decreases were from 72 to 92%. The members of the genera Pleurotus and Trametes were the most active. The litter-decomposing fungus Str. rugosoannulata degraded up to 90% of oil. All ascomycetes except G. candidum were active decomposers also: the oil decrease ranged from 60 to 84%.

On the basis of our screening data and the fungi's degradative properties, adaptive potential, and ligninolytic enzyme production, we chose the most active fungi, which hold promise for further studies and for use in biotechnology.

This research was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project no. 16-14-00081).

УДК 57.083.3

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТОКСИЧНЫХ КОНТАМИНАНТ

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

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

Разработаны высокочувствительные экспрессные тесты для определения токсичных контаминат (пестициды, детергенты) в объектах окружающей среды. Показаны возможности новых методов снижения пределов детекции низкомолекулярных антигенов.

Ключевые слова: иммунохроматография, пестициды, детергенты, высокая чувствительность

Имммунохроматография является эффективным решением для проведения экологического мониторинга. Однако, несмотря на экспрессность иммунохроматографических тестов, их чувствительность не позволяет проводить детекцию следовых количеств аналитов. В работе рассматриваются новые методы снижения предела детекции пестицидов и детергентов.

Предложено два метода повышения чувствительности тест-систем. Первый основан на прединкубации пробы с нативными специфическими антителами и мечением антивидовых антител наночастицами золота. Анализ осуществляется по конкурентной схеме, в которой используются свободные специфические антитела, а детектируемая метка вводится с помощью антивидовых антител. Использование такого подхода дало возможность избежать синтеза конъюгатов специфических антител с золотыми наночастицами, значительно снизить их концентрацию, повысить чувствительность анализа и сохранить высокую

интенсивность окрашивания. Впервые предложен вариант мультипараметрической иммунохроматографической детекции гербицидов атразина и хлорсульфурона. Пределы обнаружения атразина и хлорсульфурона составили соответственно 5 и 50 нг/мл при визуальной детекции и 0,1 и 0,8 нг/мл – при приборной, время анализа 20 минут. Показана эффективность прединкубации пробы и специфических антител, позволяющей в 10 раз снизить визуальный предел детекции по сравнению со стандартной иммунохроматографической тест-системой.

Второй метод повышения чувствительности тест-систем основан на замене наночастиц золота на маркер большего диаметра – латексные частицы. Проведена сравнительная характеристика маркеров при иммунохроматографической детекции гербицида атразина и детергента бисфенола А. Использование окрашенных латексных частиц обеспечивает снижение предела детекции атразина до 2 нг/мл и бисфенола А – до 7 нг/мл в воде, что позволяет повысить чувствительность детекции в 25 и 14 раз соответственно.

Эффективность предложенных подходов оценена для детекции гербицидов в яблочном и смородиновом соках. Степень выявления составила от 95% до 110%.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН №8 «Химический анализ и исследование структуры веществ: фундаментальные основы и новые методы».

METHODS OF THE LATERAL FLOW TEST SENSITIVITY INCREASING FOR TOXIC CONTAMINANT' DETECTION

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

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

Express tests with high sensitivity for toxic contaminant (pesticides, detergents) detection in the environment were developed. The possibilities of new methods of reducing the detection limits were exemplified the low molecular weight antigens.

Key words: lateral flow immunoassay, pesticides, detergents, high sensitivity

Lateral flow immunoassay is the effective solution for environmental monitoring. However, despite the rapidity of the lateral flow tests, sensitivity does not allow to detect trace amounts of analytes. The article deals with new methods to reduce the detection limits of pesticides and detergents.

Two methods of increasing the sensitivity of the test systems are proposed. The first one is based on the pre-incubation of the sample with native specific antibodies and antispecies antibody labeled gold nanoparticles. Analysis is carried out by competitive scheme, which uses free specific antibodies but detectable label introduced by antispecies antibodies. This approach allows the avoidance of the synthesis of specific antibody conjugates with gold nanoparticles, greatly reduce their concentration and increase the sensitivity of the assay and maintain high intensity of staining. New multiparametric lateral flow immunoassay for detection of herbicides atrazine and chlorsulfuron was offered. The detection limits of atrazine and chlorsulfuron were 5 and 50 ng/ml respectively at a visual detection and 0.1 and 0.8 ng/ml at instrumental detection. Assay time is 20 min. The pre-incubation of the samples and specific antibodies reduces the visual detection limit of 10 times compared with a standard immunoassay system.

The second method of sensitivity increasing of the test system is based on the replacement of gold nanoparticles on a larger diameter marker – latex particles. The colored markers were characterized and compared in the test systems for detection of atrazine herbicide and detergent bisphenol A. Colored latex particles provide a reduction in the detection limit of atrazine to 2 ng/ml and bisphenol A to 7 ng/ml in water, which can increase the assay sensitivity at 25 and 14 times, respectively.

The effectiveness of the proposed approaches was evaluated for the detection of herbicides in apple and black currant juices. The recovery of the toxic detection was ranged from 95% to 110%.

The work was supported by the Program of the Presidium of Russian Academy of Science N 8 «Chemical analysis and the study of the structure: fundamentals and new methods.»

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 574.652

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРИБОВ РОДА FUSARIUM SP. В БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ СТОКОВ НИТРОВАННОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

В.А. Хрячков[1], Е.А. Саратовских[2], В.А. Щербакова[3], А.В. Куликов[4], Р.Н. Яруллин[5]

[1]ФКП НИИ «Геодезия», Красноармейск, 141292
[2]Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, 142432e-mail: easar@icp.ac.ru
[3]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, 142290
[4]Межведомственный центр аналитических исследований в области физики, химии и биологии при Президиуме РАН, Москва, 117997

Ключевые слова: нитрованная целлюлоза, биоразложение, мицелиальный гриб рода Fusarium sp.

Современный уровень загрязнения природы требует проведения мероприятий по очистке различных объектов окружающей среды. В частности, сброс неочищенных производственных и бытовых сточных вод привёл к значительному ухудшению качественных показателей состояния водных объектов [1,2]. Наиважнейшими действиями для предотвращения создавшейся ситуации является обезвреживание сточных вод химических производств. Идеальная хозяйственная деятельность человека должна строиться по принципу природных экосистем, которые оптимально расходуют вещество и энергию и в которых отходы одних организмов служат средой обитания для других, т.е. осуществляется кругооборот, безотходные технологии утилизации. Особое место в решении этих задач занимают биологические методы очистки сточных вод и, в частности, сточных вод производства нитрованной целлюлозы (НЦ).

В связи с этим, нами были начаты работы по поиску наиболее эффективных микроорганизмов, способных в сроки, соответствующие запросам производства, производить биодеструкцию НЦ. Прежде всего, был составлен банк данных различных видов микророганизмов, ранее исследовавшихся для биоразложения НЦ. Были выполнены исследования по окислению НЦ с помощью бактерий Desulfovibrio desulfuricans [3]. В настоящее время, работы в этом направлении продолжены с использованием мицелиального гриба рода Fusarium solani IFO 31093, который даёт наиболее высокую степень биодеструкции НЦ (N = 13,17%). Полученные результаты показывают, что в присутствии F. solani содержание N составило 10,61% (16 суток) и 10,51% (38 суток). За 65 суток инкубации происходило снижение pH с 7,15 до 6,53. О разложении НЦ свидетельствовало появление нитрат- и нитрит- групп в среде культивирования было в пределах 11,4 мкг/мл и 3,38 мкг/мл, соответственно. Тепловыделение – 860 ккал/ч. Через 5 суток инкубации F. solani доля низкомолекулярных продуктов составляла 15%, к 65 суткам молекулярные массы этих фрагментов значительно уменьшились.

Литература:
1. *Павлов А.Н. Экология: рациональное природопользование и безопасность жизнедеятельности. М.: Высш. шк. 2005. 343с.*
2. *Белоусова А.П. Ресурсы подземных вод и их защищенность от загрязнения в бассейне реки Днепр и отдельных его областей: Российская территория. 2005. М.: ЛЕНАНД, 168с.*
3. *Саратовских Е.А., Казаков А.И., Хрячков В.А., Яруллин Р.Н. Влияние УФ обработки на биоразложение нитроцеллюлозы бактериями D. desulfuricans. Российский химический журнал. (ЖРХО им. Менделеева. 2016. Т. LX. №4. с. 106-115.*

УДК 574.652

USING FUNGI OF THE GENUS FUSARIUM SP. IN BIOTECHNOLOGY TREATMENT OF NITRATED CELLULOSE WASTEWATER

V.A. Khryachkov[1], E.A. Saratovskih[2], V.A. Scherbakova[3], A.V. Kulikov[4], R.N. Yarullin[4]

[1] Federal State-Owned Enterprise «Science Research Institute «Geodesy», Krasnoarmeysk, 141292
[2] Institute of Problems of Chemical Physics RAS, Chernogolovka, 142432 e-mail: easar@icp.ac.ru

[3] *Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino,142290*
[4]*Interdepartmental Center of analytical researches in the field of physics, chemistry and biology of the Presidium of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997*

Key words: nitrocellulose, filamentous fungus genus Fusarium solani

The current level of nature pollution requires events for cleaning of various environmental objects. In particular, discharge of untreated industrial and domestic wastewater has led to a significant worsening of qualitative indicators state of water objects [1,2]. The most important actions to prevent current situation is the treatment of waste water of chemical industries. The ideal human economic activities should be based on the principle of natural ecosystems, which are optimally consume matter and energy, it's the system where waste of one organism provide habitat for other, i.e. carried out the circuit, wasteless technologies of recycling. A special place in these tasks take place biological methods of wastewater treatment and, in particular, the nitrocellulose (NC)-manufacturing wastewater.

Thereby, we have started work on finding the most effective kinds of microorganisms capable to manufacture NC biodegradation in terms of the relevant production requests. First of all, was compiled database of various kinds microorganisms previously investigated for biodegradation NC. Studies by oxidation NC using bacteria Desulfovibrio desulfuricans were performed [3]. Currently, work in this direction continues by using filamentous fungus genus Fusarium solani IFO 31093, which gives the highest degree of biodegradation NC. Obtained results show that under the influence of F. solani (N = 13,17%) was 10,61% (16 days of exposure) and 10,51% (38 days of exposure). Changing the pH from 7.15 to 6.53 happened 65 days. The appearance of nitrite- and nitrate- groups was a maximum to the fifth days, and was in the range 11.4 mkg/ml and 3.38 mkg/ml, respectively. Heat dissipation – 860 kcal/h. After 5 days of exposure to F. solani proportion of low molecular products was 15%, after 65 days the molecular weights of this fragments greatly reduced.

1. *Pavlov A.N. Ecology: environmental management and life safety. M .: Higher. sch. 2005. 343p.*
2. *Belousova A.P. Groundwater resources and their protection against pollution in the Dnieper river basin and its separate areas: the Russian territory. 2005. M .: LENAND, 168p.*
3. *E.A. Saratovskikh, A.I. Kazakov, A.V. Kulikov, V.A. Hrachkov, R.N. Yarullin. The effect of UV treatment on biodegradation of nitrocellulose bacteria D. desulfuricans. Russian Journal of General Chemistry. 2016. T. LX. №4. p. 106-115.*

УДК: 579.6:663.1:

ТЕХНОЛОГИЯ БИОМИНЕРАЛИЗУЮЩИХ ДОБАВОК ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СТРОИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ УРОБАКТЕРИЙ

Чеканова Д.А., Градова Н.Б., профессор, д.б.н.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20 , корп. 1
e-mail: gradova_nb@mail.ru
Секция «Биотехнология и окружающая среда»

Аннотация
Одним из инновационных направлений развития биотехнологии является разработка технологии получения биопрепаратов для повышения долговечности и прочности строительных материалов. Цель данных исследований – разработка технологии получения препаратов на основе микробной минерализации, в частности использования уробактерий, способных осуществлять индуцированное осаждение карбоната кальция при разложении мочевины.

Ключевые слова: биоминерализация, уробактерии, строительные материалы

Актуальной проблемой развития биотехнологии является расширение спектра эффективного использования биотехнологических процессов и препаратов. Одним из инновационных направлений в решении данной проблемы является исследование практического использования микробной минерализации, в частности для повышения долговечности и прочности строительных материалов. Ранее была показана

возможность использования автолизатов микробных биомасс в качестве связующих компонентов для повышения прочности грунтобетонных покрытий и бетонных материалов (Градова, Шаранина, 2013; Баурина и др., 2015). Известна способность уробактерий, осуществлять индуцированное осаждение карбоната кальция при разложении мочевины (Stocks-Fischer et al., 1999).

Целью данной работы является исследование минерализационных свойств уробактерий и возможность их использования для улучшения функциональных свойств строительных материалов.

На основании широкого скрининга уробактерий при использовании в качестве критерия отбора уреазную активность, активность роста и способность осаждать CaCO3 показана высокая степень гетерогенности уробактерий по данным признакам (рис.1), и отобраны два наиболее активных штамма бактерий Bacillus sphaericus и Bacillus subtilis.

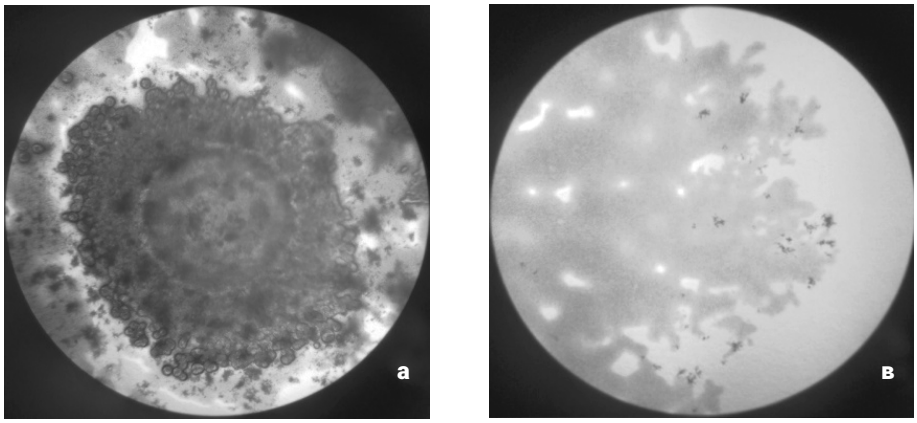


Рис. 1. Степень кальцинирования колоний, (а – кальцинированные колонии Bacillus spharicus, в – некальцинированные колонии Bacillus atrophaeus).

На основании сравнительной оценки активности роста и уреазной активности данных штаммов на средах, рекомендуемых рядом автором для культивирования уробактерий, для дальнейшей работы была использована среда Дика (Stocks-Fischer et al., 1999), модифицированная на основании проведенных нами исследований.

В лабораторных условиях при использовании суспензионной культуры бактерий Bacillus sphaericus, выращенных на модифицированной среде Дика с добавлением CaCl2, показано образование микрокристаллов кальцита культурой, при внесении в трещины гипсового камня показана санация трещин, а также получены данные о повышении прочности цементных материалов, что определяет возможность практического использования данного способа биоминерализации для улучшения свойств цементных материалов, герметизации трещин в гипсовом камне и бетоне (Сивков и др., 2016).

Для разработки технологичной формы биопрепарата исследована функциональная активность сухой биомассы клеток Bacillus sphaericus и Bacillus subtilis (лиофильно высушенной и в распылительной сушилке). Показано сохранение выживаемости и уреазной активности клеток после сушки.

Для пролонгации жизнеспособности уробактерий была исследована иммобилизация культуры на неорганических сорбентах (диатомит, трепел, активированный уголь). Исследования показали высокую степень сорбции клеток на сорбентах и более высокую функциональную активность иммобилизованных клеток по сравнению с суспензионной культурой. Полученные результаты являются основанием для разработки технологии получения биопрепарата на основе уробактерий для повышения функциональных свойств строительных материалов.

Литература:

1. *Баурина М.М., Курчавова А.С., Градова Н.Б., Эль-Регистан Г.И., Николаев Ю.А. Технология связующих добавок к грунтосмесям на основе избыточного активного ила//Московский международный конгресс «Биотехнология; состояние и перспективы развития». – 2015. – Т.2. – С.389-390.*
2. *Градова Н.Б., Шаранина Н.А. Разработка технологии получения связующих добавок к грунтоцементным смесям на основе микробных биомасс//Московский международный конгресс «Биотехнология; состояние и перспективы развития». – 2013. – Т.1. – 311 с.*
3. *Сивков С.П., Логинова Т.В., Мымрина А.К., Чеканова Д.А. Использование явления биоминерализации в дорожном и аэродромном строительстве//74 Научно-методическая и научно-исследовательская конференция, секция ОНИЛ «Цемент», «Цементные бетоны». – 2016. – С. 28-33.*
4. *Stocks-Fischer, S.; Galinat, J.K. & Bang, S.S. Microbiological precipitation of CaCO3//Soil Biol. Biochem. – 1999. – Vol.31. – C. 1563-1571.*

TECHNOLOGY OF BIOMINERALIZATION ADDITIVE BASED ON UREOLYTIC BACTERIA FOR FUNCTIONING PROPERTIES ENHANCEMENT OF BUILDING MATERIALS

Chekanova Daria Alekseevna, Gradova Nina Borisovna

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia.
e-mail: gradova_nb@mail.ru

Development of technology for obtaining biological preparations is one of the innovative directions of biotechnology to enhance the longevity and durability of building materials. The purpose of this research is to develop the technology of obtaining preparations based on microbial mineralization, in particularly, with using ureolytic bacteria, which are able to carry out induced precipitation of calcium carbonate when decomposing urea.

Key words: biomineralization, ureolytic bacteria, building materials

Expanding the range of the effective use of biotechnological processes and products is the actual problem of development of biotechnology. One of the innovative directions in solving this problem is to study the practical use of microbial mineralization, in particular to increase the longevity and durability of building materials. Previously, the use of autolysates microbial biomass was shown as a binder to enhance the strength of concrete and soil-covering materials (Gradova, Sharanina 2013; Baurina et al, 2015). Ability of ureolytic bacteria to carry out induced precipitation of calcium carbonate by the decomposition of urea is known (Stocks-Fischer et al., 1999).

The aim of this work is to study the properties of ureolytic bacteria for mineralization and the possibility of their use for improving the functional properties of building materials.

The two most active strains of bacteria Bacillus sphaericus and Bacillus subtilis been selected on the basis of a broad screening ureolytic bacteria when used as a selection criteria urease activity, the growth of the activity and the ability to precipitate of CaCO3, the high degree of heterogeneity of ureolytic bacteria according to indications shown (Figure 1).

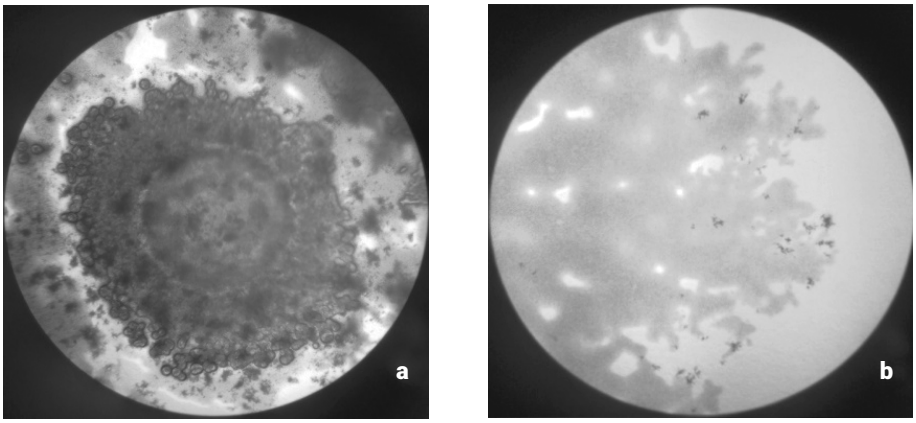


Fig. 1. The degree of calcination of colonies (a - calcified colonies of Bacillus spharicus, b - uncalcined colony of Bacillus atrophaeus).

Dick nutritional medium was selected on the basis of a comparative evaluation of growth activity, urease activity of these strains on the media, the recommended number of authors for the cultivation ureolytic bacteria (Stocks-Fischer et al., 1999), Dick nutritional medium modified based on the research conducted by us was used for further work.

The formation of micro-crystals of calcite by suspension culture of bacteria Bacillus sphaericus has been grown on a modified Dick medium with the addition of CaCl2 shown in laboratory conditions, sanitation of cracks is shown at introduction of bacteria into the cracks of gypsum, also data on improving strength of cementitious materials obtained that determines the possibility of the practical use of this method of the biomineralization to improve properties of cementitious materials, sealing cracks in stone and concrete, gypsum (Sivkov et al., 2016).

Functional activity of the dry biomass of Bacillus sphaericus and Bacillus subtilis cells (freeze-dried, spray

dryer) was investigated for the development of technologically advanced forms of biological product. Survival preservation and the urease activity of the cells after drying is shown.

Immobilization of culture on inorganic sorbents (diatomite, trepel, activated carbon) was investigated for the prolongation of viability ureolytic bacteria. Studies have shown a high degree of sorption on sorbents cells and a higher functional activity of immobilized cells compared to suspension culture. Received results are the basis for the development of technology for obtaining a biological preparation based on ureolytic bacteria to improve the functional properties of building materials.

УДК 579.222; 579.6

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ RHODOCOCCUS ПРОДУЦИРОВАТЬ ТРЕГАЛОЛИПИДНЫЕ БИОСУРФАКТАНТЫ КАК ВАЖНЫЙ ФАКТОР В БИОДЕГРАДАЦИИ Н-ГЕКСАДЕКАНА

Лыонг Т.М.[1], Понаморева О.Н.[1], Нечаева И.А.[1], Петриков К.В.[2], Филонов А.Е.[2]

[1]ФГОБУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия
300012, Тула, Проспект Ленина, 92
e-mail: luongmo@mail.ru
[2]ФГУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, Пущино, Россия

Бактерии-нефтедеструкторы Rhodococcus эффективно продуцируют биосурфактанты как при 26°С, так и при 10°С. Биосурфактанты идентифицировали как эфиры трегалозы и янтарной, октановой, декановой кислот. Трегалолипиды выполняют эмульгирующую функцию при 26°С и способствуют адгезии бактерий к твердому н-гексадекану при 10°С.

Ключевые слова: биосурфактанты, трегалолипиды, Rhodococcus, низкая температура

С развитием добычи и транспортировки нефти на территориях с холодным климатом, происходит загрязнение окружающей среды углеводородами нефти, которые значительно влияют на экологические процессы в этих регионах [1]. В настоящее время широко используют микроорганизмы для очистки нефтезагрязненных территорий. Бактерии рода Rhodococcus – эффективные деструкторы в экстремальных условиях окружающей среды и продуцируют трегалолипидные биосурфактанты, обладающие хорошей поверхностной и эмульгирующей активностью, биодеградебельностью, низкой токсичностью [2]. В данной работе исследовали влияние температуры на способность бактерий-нефтедеструкторов Rhodococcus sp. S67 и X5 продуцировать трегалолипиды при росте на н-гексадекане и роль трегалолипидных биосурфактантов в биодеградации. Культивирование бактерий в течение 12 суток при 10оС проводило к снижению поверхностного натяжения до 45 мН/м и 32 мН/м для S67 и X5 соответственно. Степень адгезии клеточной поверхности к н-гексадекану, которую определяли MATH-тестом, составила 88% (S67) и 73% (X5). Это свидетельствует о том, что Rhodococcus способны продуцировать биосурфактанты при пониженных температурах. Трегалолипидные биосурфактанты охарактеризовали методом тонкослойной хроматографии и идентифицировали методами тандемной масс-спектрометрии и газовой хроматографии [3]. Основными гликолипидными компонентами, продуцируемыми бактериями Rhodococcus как при 10оС, так и при 26оС являются гомологи тетраэфиров трегалозы и янтарной, октановой, декановой кислот. Выделенные сукциноилтрегалолипиды обладают высокой поверхностной активностью – 27 мН/м, индекс эмульгирования через 24 часа составляет 55%, критическая концентрация мицеллообразования – $4.1x10^{-5}$М, гидрофильно-липофильный баланс – 7-8, максимальное количество молекул, адсорбируемых на единице площади раздела фаз $-1.27x10^{-5}$ моль/м2 и свободная энергия Гиббса при мицеллообразовании составляет -35 кДж/моль. На основе исследований биодеградации н-гексадекана в присутствии трегалолипидных биосурфактантов показали, что, при 26°С трегалолипиды выполняют эмульгирующую функцию, а при10°С способствуют адгезии бактерий к твердому субстрату – н-гексадекану.

Литература:
1. McDonald R., Knox O.G. Cold region bioremediation of hydrocarbon contaminated soils: Do we know enough? // Environ Sci Technol – 2014 – Vol.48. No (17). P. 9980-9981.

2. Alvarez H.M. Biology of Rhodococcus, Microbiology monograph 16. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. -C.293-311.
3. Лыонг Т.М., Нечаева И.А., Петриков К.В., Пунтус И.Ф., Понаморева О.Н. Бактерии-нефтедеструкторы рода Rhodococcus – потенциальные продуценты биосурфактантов // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология – 2016 – No 1(16). P. 50-60.
УДК 579.222; 579.6

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON ABILITY OF OIL-DEGRADING BACTERIA RHODOCOCCUS TO PRODUCE TREHALOLIPID BIOSURFACTANTS FOR N-HEXADECANE BIODEGRADATION

Luong T.M.[1], Ponamoreva O.N.[1] Nechaeva I.A.[1], Petrikov K.V.[2], Filonov A.E.[2]

[1]Tula State University, Tula, Russia
92 Lenin ave., Tula, 300012
e-mail: luongmo@mail.ru
[2]Institution of Science G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS at the Pushchino Biological Research Center, Russia

Oil-degrading bacteria Rhodococcus effectively have produced biosurfactants both at 26°C and at 10°C. Biosurfactants have been identified as ester of trehalose and succinic, octanoic, decanoic acids. Trehalolipids perform emulsifying function at 26°C and facilitate the bacterial adhesion to solid substrate – n-hexadecane at 10°C.

Key words: biosurfactants, trahalolipids, Rhodococcus, low temperature

The intensive exploitation and transportation of oil in cold regions cause environmental contamination by hydrocarbons, which has a significant influence on the ecological processes in those regions [1]. It is now widely use microorganisms for cleanup oil-contaminated territories. Bacteria of the genus Rhodococcus are effective destructors in extreme environment and produce trehalolipid biosurfactants, which possess high surface and emulsifying activity, biodegradable, low toxic [2]. We investigated the influence of temperature on the ability of the oil-degrading bacteria Rhodococcus sp. S67 and X5 to produce trehalose lipids when grown on n-hexadecane and the role of trehalolipid biosurfactants in biodegradation. Cultivation of the bacteria in liquid mineral medium led to decrease of surface tension of culture medium to 45 mN/m and 32 mN/m after 12 days, for S67 and X5 respectively. The adhesion of cell surface to n-hexadecane was 88% (S67) and 73% (X5). Therefore, the bacteria Rhodococcus are capable to produce biosurfactants at low temperatures. Trehalolipid biosurfactants were characterized by thin layer chromatography and identified by tandem-mass-spectrometry and gas chromatography. The major components of glycolipids, produced by Rhodococcus both at 26oC and 10oC, are tetraesters of trehalose and succinic, octanoic, decanoic acids. Isolated succinoyl trehalolipids possess high surface acitivity – 27 mN/m, emulsification index – E24=55%, critical micelle concentration – $4.1x10^{-5}$M, hydrophilic – lipophilic balance – 7-8, the maximum number of biosurfactant molecules adsorbed per unit area – $1.27x10^{-5}$ mol/m2, Gibbs free energy of micelle formation is -35 kJ/mol. Research of n-hexadecane biodegradation with trehalolipid biosurfactants shown, that trehalolipids play the emulsifying function at 26°C, and facilitate the bacterial adhesion to solid substrate – n-hexadecane at 10°C.

REFERENCES

1. McDonald R., Knox O.G. Cold region bioremediation of hydrocarbon contaminated soils: Do we know enough? // Environ Sci Technol – 2014 – Vol.48. No (17). P. 9980-9981.
2. Alvarez H.M. Biology of Rhodococcus, Microbiology monograph 16. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. -C.293-311.

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 541.135

ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ШТАММОВ ЭЛЕКТРОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ОЦЕНКА ИХ РАБОТЫ В МИКРОБНОМ ТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ.

Ягофарова А.Я., Бердимуратов К.Т., Аюпова А.Ж., Курманбаев А.А.

Национальный центр биотехнологии, Республики Казахстан, г. Астана,
010000, Астана, Кургальжинское шоссе 13/5
e-mail: almirayagy@mail.ru

Осуществлено выделение электрогенных культур из анодной части микробного топливного элемента, собранного на базе лаборатории. Выделенные культуры проверены на электрогенную активность, параллельно проведен мониторинг динамики содержания органических веществ в анодной части. Из десяти культур было отобрано три наиболее активных.

Ключевые слова: микробный топливный элемент(МТЭ), электрогенные бактерии, утилизация органических веществ, электричество.

В основе эффективной генерации электрического тока в микробном топливном элементе лежит подбор эффективной электрогенной культуры. Такие бактерии окисляют органические соединения, при этом образуя свободные электроны, при переносе электронов на электроды обеспечивают э.д.с. ячейки топливного элемента [1]. От окислительной способности электрогенных бактерий зависит мощность микробного топливного элемента [2]. Поэтому выделение наиболее активных штаммов электрогенных бактерий является актуальной задачей для повышения выходной мощности микробного топливного элемента.

Выделение электрогенные культур проводили из активного ила городских сточных вод, отобранных на станции очистки КОС ГКП «Астана Су Арнасы».

Затем выделенные культуры были сравнены между собой по степени генерации электрического тока. Для этого в анодную часть микробной топливной ячейки помещали искусственно приготовленную минеральную среду (2г CH_3COONa (х.ч), 4,4 г. KH_2PO_4 (х.ч), 3,4 г K_2HPO_4 (х.ч), 1,5г NH_4Cl(х.ч), 0,1г $MgCl_2 \times 6H_2O$(х.ч), 0,1г $CaCl_2 \times 2H_2O$(х.ч), 0,1гKCl(х.ч), 0,1г. $MgSO_4 \times 7H_2O$(х.ч), 0,005 г $MnCl_2 \times 4H2O$(х.ч), 0,001г. $NaMoO_4x \times 2H_2O$(х.ч)) и бактериальную массу соответствующей культуры. Изменения напряжения и силы тока в ячейке замеряли каждый день, в течение 7 дней.

Согласно полученным данным из десяти выделенных штаммов проявляют наибольшую электрогенную активность штаммы: К1-1, А3-1, А3-2. При этом максимальное значение напряжения в среднем составляла 0,3В, а сила тока 0,7 мА на пятые сутки.

Для определения степени разложения органических соединений в анодной части МТЭ измеряли степень химического потребления кислорода(ХПК)[3].

Установлено, что содержание органических веществ в анодной части снижается в 3 раза, так как в случае контрольного образца ХПК в среднем составила 8266±8,31мгО/л, в случаях отобранных культур значения ХПК составила в среднем 3045±8,31мгО/л.

Литература:

1. Logan B. E., Regan J. M. Microbial fuel cells challenges and applications. //Environmental Science and Technology. 2006. № 40. P. 5172-5180.
2. Федорович В.В., Мажитов Т.О., Калюжный С.В. Биотопливные элементы – новые возможности для энергетики //Катализ в промышленности. – 2004. – №1. – С. 29- 34.
3. ГОСТ 31859-2012/01.01.2014

.....

UDK 541,135

ISOLATION OF POTENTIALLY ELECTROGENIC BACTERIAL ISOLATES AND EVALUATING THE PERFORMANCE OF ELECTROGENIC STRAINS OF BACTERIA IN MICROBIAL FUEL CELLS

Yagofarova A.Y., Berdimuratov K.T., Aiupova A.Zh., Kurmanbaev A.A.

National Center for Biotechnology of Kazakhstan Republic, Astana,
010000, Astana, Korgalzhin Highway 13/5
e-mail: almirayagy@mail.ru

The selection of potentially electrogenic bacterial isolates from anodic chamber of microbial fuel cell, constructed in our laboratory. Isolated strains were tasted on electrogenic activity and simultaneously the monitoring of organic substances decomposition was made in the anodic chamber. The three most active electrogenic isolates were selected from ten.

Key words: microbial fuel cell (MFC), electrogenic bacteria, recycling organic wastewater and sludge, electricity.

The efficient generation of electricity in a microbial fuel cell totally connects with the selection of potentially electrogenic bacterial isolates. These strains can decompose organic waste then they can produce the free electrons, that electrons can be transferred to the electrodes and generate of EMF of fuel cells [1]. The power of microbial fuel cell depends on activity of electrogenic strains[2]. Therefore, the selection of the most active electrogenic bacterial isolates is an actual task in the increasing of output power of microbial fuel cell.

Isolation of electrogenic strains were made from the sludge and wastewater of sewage disposal plant Astana.

Furthermore, each selected culture was tested for electrogenic activity. For this experiment the special mineral medium (2g CH_3COONa, 4.4 g of KH_2PO_4, 3.4 g K_2HPO_4, 1.5g of NH_4Cl, 0.1g $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0.1 g of $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.1 g of KCl, 0.1g. $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.005 g $MnCl_2 \times 4H_2O$, 0.001g. $NaMoO_4x \times 2H_2O$) with inoculated strains were placed in the anodic chamber. The main parameters of MFC were measured during 7 days.

As the result, the three most active isolates: K1-1, A3-1, A3-2, were selected from ten. The strains showed the maximum voltage of 0.3V and amperage of 0.7 mA on 5th day.

The degree of organic substances decomposition in the anodic chamber was found according to the GOST 31859-2012 (State Standard)[3]. It was found, that organic substances content reduced dramatically, as the Chemical Oxygen Demand (COD) decreases more than 3 times.

It was found, that COD parameter was 8266 ± 8,31mgO/l in the control samples while in the case of selected cultures COD values was 3045 ± 8,31mgO/l.

Reference:
1. Logan B. E., Regan J. M. Microbial fuel cells challenges and applications. //Environmental Science and Technology. 2006. № 40. P. 5172-5180.
2. Федорович В.В., Мажитов Т.О., Калюжный С.В. Биотопливные элементы – новые возможности для энергетики //Катализ в промышленности. – 2004. – №1. – С. 29- 34.
3. GOST 31859-2012/01.01.2014

.....

УДК 573.6.086.83

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ УТИЛИЗАЦИИ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

Карякин Д.О.[1], Кулабухов В.Ю.[1], Мальцевская Н.В.[2], Большаков Е.А.[1], Макеев П.П.

[1]ФГБОУ ВПО «Московский политехнический университет», Москва, Россия, e-mail: dime.angeler@gmail.com;
[2]ГБПОУ «Воробьевы горы», Москва, Россия

В рамках исследования устойчивости микроводорослей к высоким концентрациям углекислого газа, показана возможность применения зеленых микроводорослей для биологического поглощения CO_2 из высококонцентрированных дымовых газов. Установлены оптимальные значения для выделенных культур в лабораторных условиях.

Ключевые слова: очистка газовых выбросов, биотехнология, углекислый газ, микроводоросли

Использование ископаемых источников энергии в топливно-энергетической и транспортной отраслях экономики приводит к увеличению концентрации парниковых газов в атмосфере.

Существуют различные способы утилизации углекислого газа: физико-химические, химические и биологические. С экономической точки зрения, основная проблема использования химических и физико-химических методов это высокая стоимость самого процесса абсорбции с учетом дополнительных затрат на транспортировку и хранение, которая негативно влияет на рентабельность большинства проектов. [2], [4]. В этой работе описывается биологический способ, основанный на биопоглощении углекислого газа с использованием фотосинтезирующих водорослей в промышленности. Наиболее выгодно использовать те виды водорослей, которые более устойчивые к высоким концентрациям углекислого газа. Биомасса микроводорослей может быть использована для получения биотоплива, (биодизель, биоэтанол и биогаз), в качестве кормовой добавки и т.д. [1] В работе рассматривались возможности реализации этапа процесса биологической очистки дымовых газов промышленных предприятий. Основной задачей данной работы было определение оптимального уровня содержания CO_2 для культивирования биомассы водорослей. Оптимальная концентрация углекислого газа позволяет достигнуть стабильного роста культуры водорослей, и соответственно, уровня поглощения CO_2.

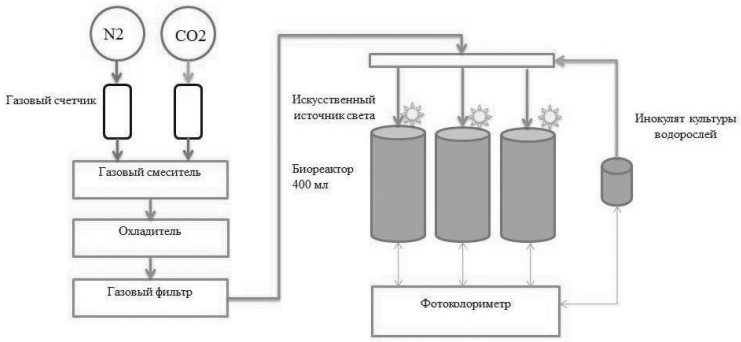


Рис. 1 Схема экспериментальной установки

В качестве модельных культур были выбраны микроводоросли Scenedesmus rubescens и Chlorella vulgaris. На рис. 1 приведена схема экспериментальной установки.

В результате эксперимента показано, что для Chlorella vulgaris самый высокий показатель прироста был при концентрации углекислого газа 4%, для Scenedesmus rubescens – при концентрации углекислого газа 8%. Данный результат важен для дальнейшей разработки стадии биологической утилизации углекислого газа. [3]

Литература:

1. De Morais M. G., Costa J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide //Energy Conversion and Management. – 2007. – Т. 48. – №. 7. – С. 2169-2173.

2. Li Y. et al. Biofuels from microalgae //Biotechnology progress. – 2008. – Т. 24. – №. 4. – С. 815-820.

3. Benemann J. R. Bio-fixation of CO2 and greenhouse gas abatement with microalgae-technology roadmap //Final Report to the US Department of Energy. National Energy Technology Laboratory. – 2003

4. Кулабухов В.Ю., Карякин Д.О., Мальцевская Н.В. Перспективы использования микроводорослей для поглощения CO2 из дымовых газов промышленных предприятий // Экология и промышленность России, 2016. Т. 20. № 9. С. 4 – 8.

.....

BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF CARBON DIOXIDE UTILIZATION

Karyakin D.O.[1], Kulabukhov V.Yu.[1], Maltsevskaya N.V.[2], Bolshakov E.A. [1], Makeev P.P.

[1] *Federal State Budget Education Institution of High Professional Education «Moscow Polytechnic University», Moscow, Russia*

[2] *State Budget Professional Education Institution «Vorobievy gory», Moscow, Russia*

Key words: purification of waste gases, biotechnology, carbon dioxide, microalgae

The use of fossil fuel in fuel, energy and transport economic sectors lead to increased greenhouse gases concentration in the atmosphere.

There are many methods of carbon dioxide utilization: physico-chemical, chemical and biological. From an economic perspective, the main problem of using chemical and physico-chemical methods is high price of absorption process (include transport and storage costs), that has a negative influence on profitability of most projects. [2], [4].

Bioabsorption of CO2 with using photosynthetic algae in industry could be real alternative of other methods. High resistant algae strains to high concentration of carbon dioxide are the most profitable than other strains. Algae biomass can use to obtain biofuel (biodiesel, bioethanol and biogas) as a nutrient, a feed additive etc. [1]

In this work, were observed possibilities of realization of biological purification waste industrial gases process stage. The main issue of this experiment was definition CO_2 optimum level for algae biomass cultivation. The optimal concentration of a carbon dioxide allows reach stable growth of algae culture and, therefore, uptake CO_2 level.

As model cultures were chose a microalgae Scenedesmus rubescens and Chlorella vulgaris. The scheme of experimental facility is shown on the figure 1

The result of experiment has shown that for Chlorella vulgaris highest level was during 4% CO_2 concentration,

for Scenedesmus rubescens was during 8% CO_2 concentration. This result is important for developing technical stage of biological utilization of carbon dioxide. [3]

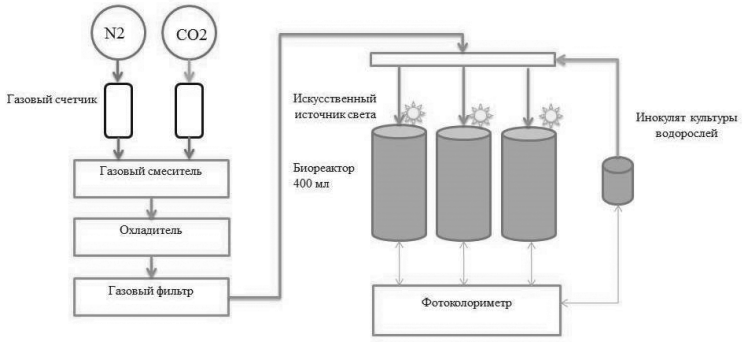


Fig.1. Experimental facility

Reference:
1. De Morais M. G., Costa J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide //Energy Conversion and Management. – 2007. – P. 48. – №. 7. – P. 2169-2173.
2. Li Y. et al. Biofuels from microalgae //Biotechnology progress. – 2008. – P. 24. – №. 4. – P. 815-820.
3. Benemann J. R. Bio-fixation of CO2 and greenhouse gas abatement with microalgae-technology roadmap //Final Report to the US Department of Energy. National Energy Technology Laboratory. – 2003
4. Kulabukhov V.Yu.., Karyakin D.O., Maltsevskaya N.V. Prospects for the Use of Microalgae to Absorb CO2 from the Flue Gases of Industrial Enterprises // Ecology and Industry of Russia, 2016. P. 20. № 9. P. 4 – 8.

.....

УДК 502:614.76:665.71

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ФИТО- И БИОРЕМЕДИАЦИИ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ В ПОЧВАХ

Синдирева А.В., Ловинецкая С.Б.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»
г. Омск, Россия
644008, Омск, Институтская пл. 1, e-mail: sindireva72@mail. ru

В статье представлены результаты лабораторных исследований почв, загрязненных нефтепродуктами. Установлено, что эффективность очистки почв методом фиторемедиации от нефтепродуктов в лабораторных условиях составляет 46…96%, биоремедиации – 86 – 88%.

Ключевые слова: нефтепродукты, почвы, фиторемедиация, биоремедиация.

Нефтяное загрязнение почв по масштабам проявления и глубине последствий занимает одно из ведущих мест в «рейтинге» экологических проблем современности. В связи с этим, разработка эффективных способов очистки почвы от загрязнения углеводородами нефти – одна из важнейших задач при решении проблемы снижения антропогенного воздействия на окружающую среду [1].

Цель исследований – разработка научно-обоснованных приемов био- и фиторемедиации почв, загрязнённых нефтепродуктами (НП).

В лабораторном эксперименте в качестве НП использовалось дизельное топливо, соответствующее ГОСТ Р 55475-2013. Для проведения модельного эксперимента были подготовлены образцы почв, с концентрацией НП 1000; 2000; 5000 и 10000 мг/кг [2]. Для фиторемедиации использовали смеси газонных трав: натуральная (райграс пастбищный – 20%, овсяница луговая – 40%, тимофеевка луговая – 40%), спортивная (райграс пастбищный – 25%, райграс однолетний – 5%, овсяница тростниковая –5%, овсяница луговая – 30%, тимофеевка луговая – 20%, фестулоллиум – 15%) и засухоустойчивая (райграс пастбищный – 20%, овсяница красная – 20%, овсяница тростниковая – 60%). В качестве контроля использовали незагрязненную почву, с начальной концентрацией НП около 40 мг/кг. Длительность эксперимента составила

1 месяц. Для биоремедиации использовался препарат «Деворойл», который представляет собой ассоциацию из пяти штаммов микроорганизмов Rhodococcus erytropolis 367-2; Rhodococcus erytropolis 367-6; Rhodococcus maris 367-5; Pseudomonas stutzeri 367-1; Candida lipolitica 367-3. Для оценки содержания НП почвенные образцы отбирались до посева растений и после их выемки. Содержание НП в почве определяли методом ИК-спектрометрии [3].

При проведении фиторемедиации в образцах почвы с исходной концентрацией загрязнителя 1000 мг/кг произошло снижение содержание НП на 92…96%, с концентрацией 2000 мг/кг – на 88…91%, с концентрацией 5000 мг/кг – на 78…82%. В образцах почв с засухоустойчивой газонной смесью это снижение произошло в большей степени. На всех образцах с концентрацией загрязнения НП 10000 мг/кг растения были сильно угнетены, при этом концентрация НП снизилась только на 46…48%. При данной концентрации фиторемедиация с помощью всех трёх газонных смесей не позволила уменьшить содержание НП до безопасного уровня, в то же время позволила ускорить процесс очищения почвы по сравнению с образцами без использования растений. В образцах почвы без применения газонных трав достоверного снижения содержания НП в почве не произошло.

По результатам исследований установлено, что при использовании биопрепарата «Деворойл» содержание нефтепродуктов снижается на 86 – 88%.

Таким образом, оба способа ремедиации способствовали достаточно эффективному снижению уровня НП в исследуемых почвах.

Литература:
1. Гогмачадзе, Г.Д. Агроэкологический мониторинг почв и земельных ресурсов Российской Федерации. – М.: Изд-во МГУ, 2010. – 592 с.
2. Синдирева А.В. Использование газонных трав для фиторемедиации почв, загрязненных нефтепродуктами / А. В. Синдирева, С.Б. Ловинецкая, В.В. Гейс // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2016.– № 1 (21). –С. 92-97.
3. Ловинецкая С.Б. Оценка содержания нефтепродуктов в почвах придорожных территорий г. Омска и Омской области и возможности их ремедиации / С.Б. Ловинецкая, В.Г. Еремеева, А. В. Синдирева //Омский научный вестник. – 2015.– № 138. –С. 241-245.

UDC 502:614.76:665.71

USING THE METHODS OF PHYTO – AND BIOREMEDIATION TO REDUCE THE CONTENT OF OIL PRODUCTS IN SOILS

Sindireva A.V., Lovinetckaia S. B.

Federal state budgetary educational institution of higher professional education «Omsk state agrarian university. P. A. Stolypin»
Omsk, Russia
644088, Omsk, Institutskaya pl. 1, e-mail: sindireva72@mail. ru

The article presents the results of laboratory studies of soils contaminated with petroleum products. It is established that the efficiency of cleaning the soil by the method of phytoremediation of petroleum products in the laboratory is 46...96%, bioremediation – 86 – 88%.

Key words: oil, soil, phytoremediation, bioremediation.

Oil pollution of soils at the scale of the consequences is one of the leading places in the «ranking» of environmental problems. In this regard, the development of effective methods of cleaning soil from pollution by petroleum hydrocarbons is one of the most important tasks in solving the problem of reducing anthropogenic impact on the environment [1].

The aim of the research is to develop science-based methods of bio – and phytoremediation of soils contaminated with petroleum products (PP).

In a laboratory experiment as PP used diesel fuel corresponding to GOST R 55475-2013. To conduct the model experiment was prepared soil samples, with the concentration of PP 1000; 2000; 5000 and 10000 mg/kg [2]. For phytoremediation used a mix of lawn grasses: natural (perennial ryegrass and 20% meadow fescue – 40%, Timothy-grass – 40%), sports (perennial ryegrass and 25% annual ryegrass 5%, and fescue reed is -5%, fescue – 30%, Timothy-grass – 20%, Festulolium – 15%) and drought tolerant (perennial ryegrass – 20%, red fescue – 20%,

fescue reed – 60%). As a control using uncontaminated soil with an initial concentration of NP of about 40 mg/kg. the Duration of the experiment was 1 month. For the bioremediation was used in the preparation «Devoroil», which is an Association of the five strains of microorganisms Rhodococcus erytropolis 367-2; Rhodococcus erytropolis 367-6; Rhodococcus maris 367-5; Pseudomonas stutzeri 367-1; Candida lipolitica 367-3. For the assessment of PP soil samples were collected before sowing of the plants and after their production. The contents of PP in the soil was determined by IR-spectrometry [3].

When conducting phytoremediation in soil samples with an initial concentration of pollutant of 1,000 mg/kg decreased the content of PP to 92...96%, with a concentration of 2000 mg/kg – 88...91%, with a concentration of 5000 mg/kg – 78...82%. In the samples of soil with drought-resistant lawn mix this decrease occurred to a greater extent. All samples with concentration of pollution PP 10000 mg/kg of the plant were severely oppressed, the concentration of PP decreased only 46...48%. When the concentrations of phytoremediation using all three of lawn mixtures are not allowed to reduce the content of PP to a safe level, at the same time allowed to accelerate the process of purification of the soil in comparison with samples without the use of plants. In soil samples without the use of lawn grasses no significant decrease of the content of PP in the soil did not happen.

By results of researches it is established that when using the biological product «Devoroil» the oil content is reduced by 86 and 88%.

Thus, both methods of remediation has contributed sufficiently effective to reduce the level of PP in the investigated soils.

Reference:
1. Gogmachadze G.D. Agroecological monitoring of soils and land resources of the Russian Federation. – M.: Izd-vo Mosk. University press, 2010.-592 p.
2. Sindireva A. V. The use of grasses for phytoremediation of soils contaminated with oil products / A. V. Sindireva, S. B. Lovinetckaya, V. V. Hayes // Bulletin of Omsk state agrarian University. – 2016.– № 1 (21). – P. 92-97.
3. Lovinetckaya S. B. Estimated oil content and remediation of soils roadside areas of the city of Omsk and Omsk region / S. B. Lovinetckaya, V. G. Eremeeva, A. V. Sindireva //The Omsk scientific bulletin. – 2015.– №. 138. –P. 241-245.

УДК 620.193.8

БОРЬБА С БИОПОВРЕЖДЕНИЯМИ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ НЕФТЕГАЗОВОГО КОМПЛЕКСА

Нишкевич Ю.А., Тропин А.Ю., Брычков В.Н., Гарипов Р.М., Козлов И.А.

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия
ОАО «Варьёганнефть», г. Радужный, ХМАО-Югра, Россия
megaharry@list.ru

Более 50% коррозионных потерь нефтепромыслового оборудования происходит в результате биоповреждений. Поэтому при разработке месторождений, транспортировке, хранении и переработке нефти, необходимо проводить микробиологический анализ.

Ключевые слова: коррозионно-опасная микрофлора, биодеструкция, нефтегазовое оборудование, микроорганизмы-деструкторы, углеводороды, бактерициды

Коррозионное разрушение нефтепромыслового оборудования не только сокращает срок его службы, но и приводит к частым аварийным изливам нефти и минерализованной пластовой воды, ведёт к загрязнению окружающей среды, и как следствие приводит ежегодно к миллиардным убыткам. Разрешение этой проблемы является важной отраслевой задачей [1, 2]. Основной ущерб, причиняемый биокоррозией, заключается не в потере металла как такового, а в огромной стоимости оборудования и изделий, разрушаемых коррозией и загрязнении окружающей среды вследствие аварийного выхода из строя оборудования. Все перечисленные факторы вынуждают проводить глубокие фундаментальные исследования, позволяющие выяснить первопричину высоких скоростей биокоррозии.

Коррозионная активность сред зависит не только от физико-химических свойств каждой фазы системы в отдельности, но и от условий добычи, сбора, подготовки и транспорта нефти, газа и воды. Защита от коррозии металлов в гетерогенных системах с помощью различных методов, конечно же, имеет свои

особенности и трудности, которые должны учитываться при разработке методов и технологий защиты.

В ходе проведённых исследований (на примере Варьёганской группы месторождений) установлено, что большей частью отказы трубопроводов и оборудования происходят вследствие комплексного воздействия трех основных факторов:

– Значительной циклической нагрузки на трубопроводы, связанной с сезонным температурным расширением и пульсацией при транспортировке жидкости в «пробковом» режиме в процессе наводораживания – растрескивание по сварным швам.

– Высоким бактериальным фоном, который провоцирует коррозию на водоводах высокого и низкого давления – питтинговая коррозия.

– Выносом с добываемой нефтью тяжелых частиц (порода, оксиды, сульфиды и др.), что провоцирует истирание внешнего слоя внутренней образующей трубопровода, вовлекая участки металла во взаимодействие с кислой средой pH-5,0. – ручейковая коррозия по нижней образующей.

Литература:
1. В. Н. Брычков В.Н., Хохлов Н.Г. Сброс попутных пластовых вод через ТВО // Оборудование и технологии для нефтегазового комплекса. – 2009. – № 3. – С. 48-57.
2. Свинарёв В.В., Хабибуллин И.И., Брычков В.Н. и др. Коррозия. Способы борьбы с коррозией: научно-техническое издание. – Уфа, 2009. – 60 с.

THE FIGHT AGAINST BIODETERIORATION IN THE OIL AND GAS COMPANIES

Nishkevich, Yu. A., Tropin, A. Yu., Brychkov, V. N., Garipov, R. M., Kozlov, I. A.

National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
Nizhny Novgorod, Russia Federation
JSC Vareganneft, Raduzhny, KHMAO-Yugra, Russian Federation
megaharry@list.ru

More than 50% of the corrosion losses of the oilfield equipment is the result of biological damage. Therefore, during mining, transportation, storage and processing of oil, necessary to carry out microbiological analysis.

Key words: corrosion-hazardous microorganisms, biodegradation, oil and gas equipment, microorganisms-destructors of hydrocarbons, bactericides

Corrosion failure of oil field equipment not only reduces its life but also lead to frequent emergency the spout of the oil and mineralized formation water leads to pollution of the environment, and as a consequence leads annually to billions in losses. A solution to this problem is an important industry problem [1, 2]. The main damage caused by corrosion, is not the loss of metal itself, but in the huge cost of the equipment and products being destroyed by corrosion and environmental pollution due to emergency failures of the equipment. All these factors are forced to conduct deep fundamental research to determine the root cause of high rates of bio-corrosion.

Corrosive environments depends not only on the physic-chemical properties of each phase of the system individually, but also on the conditions of production, gathering, preparation and transportation of oil, gas and water. Corrosion protection of metals in heterogeneous systems using different methods, of course, has its own characteristics and challenges that should be considered in the development of methods and technologies of protection.

In the course of the study (for example Varegangroup of fields) found that for the most part the failure of pipelines and equipment caused by complex influence of three main factors:

– Significant cyclic loads on piping related to seasonal thermal expansion and a surge in transportation of liquid in «cork» mode in the process of hydrogenation – cracking at the welds.

– High bacterial background, which causes corrosion of water conduits, high and low pressure – pitting corrosion.

– Removal from extracted oil of heavy particles (rocks, oxides, sulfides, etc.), which causes abrasion of the outer layer of the inner generatrix of the pipeline, involving portions of the metal interacting with the acidic environment of pH – 5.0. – rib corrosion on the bottom forming.

References:
1. Brychkov, V. N., Khokhlov, N. G. Reset Associated Produced Water through Pipe Separators of Water (PSW) //

Equipment and Technologies for Oil and Gas Industry. – 2009. – No. 3. – P. 48-57.
2. *Svinarev, V. V., Khabibullin, I. I., Brychkov, V. N. etc. Corrosion. Methods of Control Corrosion: Scientific and Technical Publishing. – Ufa, 2009. – 60 p.*

УДК581.6:582.47:674.8

УТИЛИЗАЦИЯ КОРЫ ХВОЙНЫХ ПОРОД С ПОЛУЧЕНИЕМ ПРОДУКТОВ ТЕХНИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Семенович А.В., Шапченкова О.А., Анискина А.А., Пермякова Г.В., Петрунина Е.А., Лоскутов С.Р.

ФГБУН ФИЦ КНЦ СО РАН – обособленное подразделение Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, Россия
660036, Красноярск, ул. Академгородок, 50/28
e-mail: semenovich_a@ksc.krasn.ru

Модифицированием коры хвойных пород Сибири получены биосорбенты различного назначения.

Ключевые слова: кора хвойных; утилизация коры; модифицирование; сорбент; катионы металлов; нефть.

До настоящего времени кора хвойных пород остаётся многотоннажным отходом окорки древесины в Сибири. С одной стороны, ее утилизация проводится в ограниченных масштабах, значительные объёмы вывозят в отвалы, закапывают, сжигают. С другой стороны, кора является сырьем для производства биосорбентов, применяемых для очистки вод, загрязненных тяжелыми металлами, нефтепродуктами, красителями [1]. Использование натуральной коры влечет за собой необходимость устранения вторичного загрязнения очищаемого стока. Химическое модифицирование коры позволяет целенаправленно изменять её свойства.

Цель настоящей работы – изучение сорбционных свойств биосорбентов, полученных модифицированием коры хвойных сибирских пород (Larix sibirica Ledeb, Pinus sylvestris L. и Abies sibirica L.), по отношению к катионам Cr3+, Cu2+, Ni2+, Pb2+,Zn2+ и нефти.

В докладе предложены два способа утилизации коры. Первый способ основан на модифицировании коры методом фенолформальдегидной поликонденсации в присутствии кислотных (H2SO4, HNO3) и щелочного (NaOH) катализаторов [2]. Начальные концентрации катионов (Cr3+, Cu2+, Ni2+, Pb2+, Zn2+) в растворах составляли 10 и 200 мг/дм3. Эксперимент был выполнен в статических условиях. Сорбционная ёмкость коры варьировала от 0,57 до 46,26 мг/г. Степень извлечения катионов из водных растворов достигала 84%. Сорбенты характеризовались малой насыпной плотностью (0,15 – 0,23 г/см3) и невысокой степенью набухания в воде (0,19 – 0,24).

Наиболее эффективным сорбентом для извлечения катионов Cu2+, Pb2+, Zn2+ из водных растворов является модифицированная кора сосны (Pinus sylvestris L.), катионов Cr3+ – модифицированная кора лиственницы (Larix sibirica Ledeb.). Максимальная сорбционная способность по отношению к катионам металлов проявилась у коры всех пород модифицированной в присутствии щелочного катализатора. Способность сорбентов извлекать катионы металлов из высококонцентрированных растворов выше, чем из растворов с низкой концентрацией катионов в растворе. Катионы Pb2+ и Zn2+сорбируются из растворов лучше, чем другие катионы всеми препаратами коры, хуже всего извлекаются из растворов катионы Cr3+.

Комплексная утилизация коры вторым способом основана на получении из коры экстрактов, перспективных для дальнейшей переработки, и твердого остатка после экстракции как поглотителя сырой нефти. Экстракция коры горячей водой с моноэтаноламином или триэтаноламином в качестве добавки позволяет извлекать из коры хвойных до 69% низкомолекулярных веществ. Групповой состав экстрактов включает кверцетин, дегидрокверцетин, бензойную, салициловую, коричную кислоты, фенолы (фенол, гваякол, мета-, пара- и орто-крезолы, 2,6-ксиленол). Твердые остатки коры после экстракции способны поглощать сырую нефть с твердой поверхности, их поглотительная способность варьирует в диапазоне 1,71-2,96 г нефти /г воздушно-сухой коры. Наилучшей поглотительной способностью по отношению к нефти обладает твердый остаток коры сосны (Pinus sylvestris L.) после экстракции горячей водой с добавлением моноэтаноламина.

Литература:
1. *Oh M., Tshabalala M.A. Pelletized ponderosa pine bark for adsorption of toxic heavy metals from water // Bioresources. 2007. Vol. 2. № 1. P. 66-81.*
2. *Семенович А.В. Сорбционные свойства модифицированной коры Larix sibirica L., Pinus sylvestrisL., Abies sibirica L.: дис.... канд. хим, наук.- Красноярск, 2013.- 178 с.*

UDC581.6:582.47:674.8

UTILIZATION OF BARK OF CONIFEROUS TREE SPECIES WITH THE RECEIPT OF THE PRODUCTS FOR TECHNICAL PURPOSES

Semenovich A.V., Shapchenkova O. A., Aniskina A. A., Permyakova G. V., Petrunina, E. A., Loskutov S. R.

V.N. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences - Detached division of FSC KSC SB RAS Krasnoyarsk, Russia
660036, Krasnoyarsk, street Akademgorodok, 50/28
e-mail: semenovich_a@ksc.krasn.ru

Biosorbents have been obtained by modification of bark of conifers of Siberia.

Key words: bark of conifers; utilization of bark; modification; sorbent; metal cations; crude oil.

To date, the large amounts of bark are generated every year by processing enterprises of forest industry of Siberia (Russia). On the one hand, the bark utilization is limited, the significant amounts of bark are transported to dumps, buried, or burned. On the other hand, the bark is one of the most abundant resources for production of biosorbents for treatment of waters contaminated by heavy metals, toxic oily wastes, and dyes [1]. The use of natural bark is limited by the necessity to eliminate the secondary pollution of the cleaned drain. Chemical modification allows to purposefully change the bark properties.

The aim of this work is to study the sorption properties of biosorbents obtained by modification of the bark of coniferous tree species (Larix sibirica Ledeb., Pinus sylvestris L. and Abies sibirica L.) in relation to the metal cations (Cr3+, Cu2+, Ni2+, Pb2+, Zn2+) and oil.

Two ways of bark utilization are proposed in this work. The first way is based on the modification of bark by the method of phenol-formaldehyde polycondensation in the presence of acid (H2SO4, HNO3) and alkaline (NaOH) catalysts [2]. The initial concentrations of Cr3+, Cu2+, Ni2+, Pb2+, Zn2+ in aqueous solution were 10 and 200 mg/dm3. The experiments were performed under static conditions. The sorption capacity of bark determined in these conditions varied from 0,57 to 46,26 mg/g. The degree of metal cations removal from aqueous solutions reached 84%. The sorbents were characterized by low bulk density (0,15–0,23 g/cm3) and low degree of swelling in water (0,19–0,24).

The most effective sorbents for the removal of Cu2+, Pb2+, Zn2+, and Cr3+ from aqueous solutions were the modified bark of Pinus sylvestris L., and Larix sibirica Ledeb., respectively. The bark of all tree species studied modified by formaldehyde with sodium hydroxide as catalyst showed the highest sorption capacity for metal cations. The ability of sorbents to remove metals from aqueous solution was higher at initial metal concentration of 200 mg/dm3 compared to 10 mg/dm3. The removal of metals from aqueous solutions by all samples of modified bark found to be more effective for Zn2+ и Pb2+ and worse for Cr3+ compared to other cations.

The second way is obtaining the bark extracts which can be used for the further processing and the solid residue after extraction as a sorbent of the crude oil. Extraction of bark by hot water with monoethanolamine or triethanolamine as an additive allows to extract up to 69% of low molecular weight substances from the bark of conifers. Group composition of extracts includes quercetin, dihydroquercetin, benzoic, salicylic, cinnamic acid, phenols (phenol, guaiacol, meta-, para – and ortho-cresols, 2,6-xylenol). The solid residue after bark extraction is able to adsorb crude oil from the solid surface. The adsorption capacity of the solid residues in relation to crude oil varied from 1,71 to 2,96 gram crude oil per gram air-dry sorbent. The solid residue of Pinus sylvestris L. bark after extraction by hot water with addition of monoethanolamine was characterized by the best adsorption capacity.

Reference:
1. Oh M., Tshabalala M.A. Pelletized ponderosa pine bark for adsorption of toxic heavy metals from water // Bioresources. 2007. Vol. 2. № 1. P. 66-81.
2. Semenovich A. V. Sorption properties of the modified bark Larix sibirica Ledeb., Pinus sylvestris L., Abies sibirica L.: dis....cand. khim, nauk. - Krasnoyarsk, 2013.- 178 c.

УДК [577.117+582.263]57.044

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЛИПИДОВ У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ (НА ПРИМЕРЕ CHLORELLA VULGARIS BEIJ.) ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ

Боднар О.И., Винярская Г.Б., Лукашив О.Я., Грубинко В.В.

Тернопольский национальный педагогический университет им. В. Гнатюка
46027, Украина, г. Тернополь, ул. М. Кривоноса, 2, кафедра общей биологии и методики обучения естественных дисциплин
e-mail: bodnar_oi@yahoo.com

Изучали влияние ионов Mn2+, Zn2+, Cu2+ и Pb2+ на активность, направленность и локализацию биосинтеза липидов у Chlorella vulgaris Beij. с целью разработки технологий управляемого получения водорослевых липидов для биотоплива и биологически активных веществ.

Ключевые слова: микроводоросли, липиды, металлы.

В настоящее время доказана эффективность и перспективность использования липидов микроводорослей для получения биотоплива и биологически активных препаратов [2]. В водорослево-топливной индустрии в настоящее время актуальными являются два направления: 1) увеличение валового содержания липидов в клетках за счет технологических манипуляций и использования регуляторов активации биосинтеза липидов; 2) направленная регуляция биосинтеза отдельных классов липидов – компонентов биотоплив и биологически активных веществ [2].

Учитывая эти подходы нами разработана технология повышения содержания липидов и их отдельных фракций путем направленной регуляции липидного обмена у Chlorella vulgaris Beij. Биотехнологически эффективными для накопления липидов водорослями было влияние: Mn2+ (0,2 мг/дм3, 3 суток) увеличивает содержание общих липидов на 47%, Zn2+ (5 мг/дм3, 7 суток) – на 15%, Cu2+ (0,002 мг/дм3, 3 суток) – на 33%, Pb2+ (0,5 мг/дм3, 7 суток) – на 32% по сравнению с контрольными показателями.

Установлено, что процесс поглощение ионов Mn2+, Zn2+, Cu2+ и Pb2+ клетками хлореллы является флуктуационными и осуществляется в четыре этапа: этап защитной самоизоляции клеток (стресс-реакция), стадия активного поглощения ионов металлов, стадии вторичного подавления поглощения и стадия восстановления активного поглощения, что соотносится со структурной и функциональной реконструкцией клеточной мембраны – формированием второго концентрического слоя клеточной оболочки, состоящей преимущественно из липидов [4].

Исследуемые факторы способствуют накоплению липидов на 15-113% относительно контроля, включительно: триацилглицеролов – на 36-181%, диацилглицеролов – на 6-190%, фосфолипидов – на 1,6-10,5%, неэтерифицированных жирных кислот – на 49-257%. При этом, в первую очередь, синтезируются три- и диацилглицеролы с остатками ненасыщенных жирных кислот, а также полярные фосфолипиды. Соотношение основных классов липидов (ТАГ: ДАГ: ФЛ: НЭЖК,%) в контроле было 22:16:47:15, при действии Mn2+ – 27: 25: 28: 20, Zn2+ – 26:16: 33:25, Cu2+ – 22: 22: 39: 17, Pb2+ – 21: 21: 37: 21.

Установлено, что в присутствии в среде культивирования ионов металлов уменьшается количество и их способность синтезировать липиды, однако содержание триацилглицеролов и фосфолипидов повышается в результате адаптивной активации биосинтеза липилов в цитоплазматических структурах [5]. Субстратами для биосинтеза липидов при воздействии исследованных ионов металлов является глицерол-3-фосфат, образованный в результате фосфорилирования глицерола, и ацил-КоА, образованный из аминокислот [3]. Обеспечение энергией биосинтеза липидов у хлореллы в среде с ионами металлов происходит благодаря активации цикла Кребса, о чем свидетельствуют увеличение активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы (на 5% и 35% при действии Zn2+ и Cu2+ соответственно) и сукцинатдегидрогеназы (в 2,8-5,6 раза при действия всех исследованных ионов металлов).

Для непрерывного культивирования хлореллы в квазистационарном режиме и получения липидной субстанции сконструирован оригинальный фотобиореактор проточного типа с возможностью: автоматического перемешивания культуры в зависимости от условий, установленных алгоритмом автоматического поддерживания pH, температуры, интенсивности освещения, питания углекислотой, фильтрованием и дезинфекацией входящих питательных веществ [1].

Литература:

1. *Bodnar O.I., Burega N.V., Palchyk, A.O. Viniarska H.B., Grubinko V.V. Optimization of Chlorella vulgaris Beij. cultivation in a bioreactor of continuous action // Biotechnologia Acta, V. 9, No 4, 2016 P. 42 – 49.*

2. Campbell M.N. Biodiesel: algae as a renewable source for liquid fuel // Guelph Engineering J. 2008. № 1. P. 2-7.
3. Grubinko V.V., Gorda A.I., Bodnar O.I., Klochenko P.D. Metabolism of Algae under the Impact of Metal Ions of the Aquatic Medium // Hydrobiol. J. 2011. Vol. 47, N 6. P. 75-88.
4. Kostyuk K.V., Grubinko V.V. Change of Composition of the Cellular Membranes of the Aquatic Plants under the Impact of Toxic Substances // Hydrobiol. J. 2012. Vol. 48, N 4. P. 75–92.
5. Lutsiv A.I., Grubinko V.V. Localization of the Lipid's Synthesis in Chlorella vulgaris under the Impact of Lead and Zinc and Diesel Fuel // Hydrobiol. J. 2012. Vol. 48, N 6. P. 95–106.

UDC [577.117+582.263]57.044

REGULATION OF LIPID BIOSYNTHESIS IN MICROALGAE BY METAL IONS (ON THE EXAMPLE OF CHLORELLA VULGARIS BEIJ.)

Bodnar O.I., Viniarska H.B., Lukashiv O.Ya., Grubinko V.V.

V. Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine
46027, Ukraine, Ternopil, M. Krivonis St., 2, TNPU, Department of General Biology and Methods of Teaching Natural Sciences
e-mail: bodnar_oi@yahoo.com

Key words: microalgae, lipids, metals.

We studied the effect of Mn2+, Zn2+, Cu2+ and Pb2+ ions on the activity, direction and localization of lipid biosynthesis in Chlorella vulgaris Beij., aiming to develop new technologies of algal lipids managed production for its future usage in biofuel and production of biologically active substances.

Currently, the proven effectiveness and prospects of lipid microalgae use in the process of biofuel synthesis and in development of bioactive medications [2]. In algal biofuel industry now there are two main trends: 1) increase the gross (total) content of lipids in cells through technological manipulation and usage of biosynthesis regulators and lipids accumulation; 2) directed regulation of certain lipid classes biosynthesis – as main components of biofuel and biologically active substances [2].

According to these approaches we are on the way of developing the technology of increasing the amount of lipids and their separate fractions using directed regulation of lipid metabolism in Ch. vulgaris biotechnologically effective for lipid accumulation in algae is the influence of: Mn2+ (0,2 mg/dm3, 3 days) which increases the amount of total lipids by 47%, Zn2+ (5 mg/dm3, 7 days) – by 15%, Cu2+ (0,002 mg/dm3, 3 days) – by 33%, Pb2+ (0,5 mg/dm3, 7 days) – by 32% while comparing to the benchmarks.

It is established that absorption of ions of Mn2+, Zn2+, Cu2+ and Pb2+ by cells of chlorella is fluctuating and is carried out in four stages: the stage of protective self-isolation of cells (stress-reaction), the stage of the active absorption of metals, the stage of secondary inhibition of the absorption, and the stage of restoring active absorption, that correspond with structural and functional reconstruction of cell membrane – the formation of «double concentric membranes» [4].

It is showed that investigated factors contribute to the accumulation of lipids by 15-113%, including triacylglycerols – by 36-181%, dyacylglycerols – by 6-190%, phospholipids – by 1.6-10.5%, unesterified fatty acids – by 49-257% compared to control subjects. Herewith, there are synthesized first of all polar phospholipids, also tri- and dyacylglycerols with residues of unsaturated fatty acids. Ratio of major classes of lipids (TAG: DAG:PL: UFA,%) in the control was 22:16:47:15, for the actions of: Mn2+ – 27:25:28:20, Zn2+ – 26:16:33:25, Cu2+ – 22:22:39:17 and Pb2+ – 21:21:37:21.

Under the action of metal ions, it is established the reducing the size and increasing the number of chloroplasts in the cell, as a result there is a change of their ability to synthesize lipids. It is found that under the impact factors with decreases of number and modification of chloroplasts the content of triacylglycerols and phospholipids increases as a result of adaptive change of the localization of lipid biosynthesis from chloroplasts into cytoplasmic structures [5].

It was revealed that the main substrates for the lipid biosynthesis after adding the investigated metal ions are glycerol-3-phosphate formed as a result of glycerol phosphorylation, and acyl-CoA formed from amino acids [3]. Energy provision of lipid biosynthesis in chlorella in a medium with metal ions is happening due to the activation of the Krebs cycle, as evidenced by increased activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase (by 5% and 35% after adding Zn2+ and Cu2+ respectively) and succinate dehydrogenase (in 2,8-5,6 times after adding all studied metal ions).

For continuous cultivation of chlorella in a quasi-stationary mode and receiving lipid substance was designed the original flow type photobioreactor. The bioreactor has the ability to automatically mix the culture depending on conditions established by the algorithm, maintaining pH, temperature, light intensity, carbon dioxide supply, filter and sanitize incoming nutrients [1].

References:
1. Bodnar O.I., Burega N.V., Palchyk, A.O. Viniarska H.B., Grubinko V.V. Optimization of Chlorella vulgaris Beij. cultivation in a bioreactor of continuous action // Biotechnol. Acta, 2016. V. 9, No 4. P. 42 – 49.
2. Campbell M.N. Biodiesel: algae as a renewable source for liquid fuel//Guelph Engineering J. 2008. № 1. P. 2 – 7.
3. Grubinko V.V., Gorda A.I., Bodnar O.I., Klochenko P.D. Metabolism of Algae under the Impact of Metal Ions of the Aquatic Medium // Hydrobiol. J. 2011. Vol. 47, N 6. P. 75 – 88.
4. Kostyuk K.V., Grubinko V.V. Change of Composition of the Cellular Membranes of the Aquatic Plants under the Impact of Toxic Substances // Hydrobiol. J. 2012. Vol. 48, N 4. P. 75–92.
5. Lutsiv A.I., Grubinko V.V. Localization of the Lipid's Synthesis in Chlorella vulgaris under the Impact of Lead and Zinc and Diesel Fuel // Hydrobiol. J. 2012. Vol. 48, N 6. P. 95–106.

УДК 579.66: 579.68: 579.083.13

ЕСТЕСТВЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ КАСПИЙСКОГО МОРЯ

Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г., Ауэзова О.Н., Спанкулова Г.А., Бектемисова С.А.

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан
050010, ул. Богенбай батыра, 103
e-mail: ecomicrolab@gmail.com

Методом накопительных культур из прибрежных вод и донных отложений Северного Каспия выделено 8 естественных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов. Определен их количественный состав. Установлено, что только три ассоциации показали высокую эффективность при росте на минеральной среде с нефтью.

Ключевые слова: нефтеокисляющие микроорганизмы, естественные ассоциации, нефтеокисляющая активность, деструкция нефти

Загрязнение нефтью и нефтепродуктами является одним из самых сложных видов технологического воздействия на природные экосистемы. В Северном Каспии загрязнение от разработок нефти до последних лет было незначительным. Ситуация поменялась с началом работ по освоению месторождений Тенгиз и Кашаган. Именно здесь риск загрязнения максимален из-за мелководья, высоких пластовых давлений и т.д. В связи с этим, все более актуальной становится разработка рациональных способов очистки природных сред от углеводородов нефти и, в частности, биоремедиация.

Из образцов прибрежных вод и донных отложений Северного Каспия были получены накопительные культуры с использованием нефти в качестве элективного фактора. Путем последовательных пересевов и увеличением концентрации вносимой нефти с 1% до 5% было получено 8 естественных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов. Установлено, что в состав каждой из естественных ассоциаций входило от 5 до 8 бактериальных культур. Все изоляты были проверены на способность к росту на нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. Результаты исследования показали, что не все культуры обладали нефтеокисляющей активностью.

В результате изучения деструктивной способности полученных ассоциаций установлено, что при 1%-ном содержании нефти в среде только три из них активно утилизировали нефть – 62,2-79,1% за 14 суток. При культивировании остальных ассоциаций содержание нефти в среде снижалось только на 29-31%. При концентрации нефти 3% степень ее деструкции естественными ассоциациями снижалась. Так, при воздействии эффективных ассоциаций количество утилизированной нефти в среде составило 41-54% за тот же период времени.

UDC 579.66: 579.68: 579.083.13

NATURAL ASSOCIATIONS OF OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS OF THE COASTAL ZONE OF THE CASPIAN SEA

Sadanov A.K., Aitkeldiyeva S.A., Faizulina E.R., Tatarkina L.G., Auezova O.N., Spankulova G.A., Bektemisova S.A.

RSE «Institute of Microbiology and Virology» KS MES RK, Almaty, Kazakhstan
050010, Bogenbay batyr str., 103
e-mail: ecomicrolab@gmail.com

8 natural associations of oil-oxidizing microorganisms were isolated from coastal waters and sediments of the Northern Caspian Sea by the method of accumulative cultures. Their quantitative structure is determined. It is established that only three associations showed high efficiency when grown on mineral medium with oil.

Key words: the oil-oxidizing microorganisms, natural associations, the oil-oxidizing activity, oil destruction

Pollution by oil and oil products is one of the most difficult types of technological impact on natural ecosystems. In the Northern Caspian Sea pollution from developments of oil until recent years was insignificant. The situation exchanged from the beginning of works on development of fields Tengiz and Kashagan. This is where the risk of contamination is greatest because of the shallow water, high reservoir pressures, etc. In this connection, it is becoming increasingly urgent development of rational methods of purification of natural environments of petroleum hydrocarbons and, in particular, bioremediation.

From samples of coastal waters and sediments of the Northern Caspian Sea accumulative cultures with use of oil as an elective factor were received. By serial passage and increase in concentration of oil with 1% up to 5% 8 natural associations of the oil-oxidizing microorganisms were received. It was found that in each of the natural associations included from 5 to 8 bacterial cultures. All isolates were tested for the ability to grow on oil as the sole carbon and energy source. The results showed that not all cultures possess oil-oxidizing activity.

As a result of studying of a destructive capability of the received associations it is established that in case of 1% content of oil in the medium only three of them actively utilized oil – 62,2-79,1% in 14 days. In case of cultivation of other associations, content of oil in the medium decreased only by 29-31%. In case of concentration of oil of 3% degree of its destruction by natural associations decreased. So, in case of impact of effective associations the amount of the utilized oil in the medium made 41-54% for the same period of time.

.....

УДК 615.076.7

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АНТИБИОТИКОВ ПЕНИЦИЛЛИНОВОГО РЯДА НА МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗУ АКТИВНОГО ИЛА

Мащенко З.Е.[1], Маслова Е.В.[1], Расцветова Н.В.[2], Шаталаев И.Ф.[2]

[1] ФГБОУ ВО Самарский государственный технический университет, Самара, Россия 443100, г. Самара, ул. Куйбышева, 152
e-mail: mzinaida@yandex.ru
[2] ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, Самара, Россия

Проведено сравнительное исследование влияния антибиотиков пенициллинового ряда на активность малатдегидрогеназы активного ила. Установлена зависимость состава молекулярных форм фермента от времени инкубации и концентрации антибиотиков.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа; активный ил; бензилпенициллина натриевая соль; ампициллин.

Здоровье и благополучие человека находится в тесной взаимосвязи с состоянием окружающей среды, том числе и водных ресурсов. В настоящее время наблюдается существенное увеличение загрязнения окружающей среды антимикробными средствами, вследствие широкого использования названных препаратов в медицине и ветеринарии. Антибиотики, присутствующие в сточных водах городов и промышленных предприятий, являются потенциально опасными загрязнителями. В современных установках широко используют биологические методы очистки сточных вод, в частности очистку активным илом. Поэтому целесообразно оценить их влияние на микроорганизмы активного ила. В качестве биоиндикации работы очистных сооружений можно использовать данные о составе молекулярных форм (МФ) малатдегидрогеназы (МДГ) активного ила[1].

Цель исследования – изучение влияния пенициллиновых антибиотиков (бензилпенициллина натриевая соль и ампициллин) на состав молекулярных форм малатдегидрогеназы активного ила.

В экспериментах использовали активный ил очистных сооружений г. Самара. Инкубацию осуществляли в течение 24 часов. Отбор проб для определения МФ МДГ проводили через 1 и 24 часа. Концентрацию

антибиотиков варьировали в количестве 10, 40 и 70 мг/г биомассы. Определяли МФ МДГ методом электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле (электродный буфер – трис-ЭДТА-боратный буфер – pH 9,2). Выявление изоформ МДГ проводили с помощью феназинметасульфаттетразолиевой реакции [1,2].

В течение первого часа инкубации в контроле и опытных сериях с бензилпенициллином натриевой соли концентрацией 10 и 40 мг/г выявлены две МФ фермента – МДГ-1 и МДГ-3, причем в опыте в области МДГ-3 установлено две активные зоны. В пробе с концентрацией антибиотика 70 мг/г еще выявлена МДГ-2 в виде двух зон активности.

В течение первого часа инкубации в контроле и опытных сериях с ампициллином обнаружены две МФ фермента – МДГ-2 и МДГ-3. При этом в области МДГ-3 определены две активные зоны. В образце с концентрацией антибиотика 70 мг/г биомассы ила МДГ-2 также представлена двумя активными зонами.

По истечению суток в контроле для бензилпенициллина натриевой соли определено три МФ – МДГ-1, МДГ-2 и МДГ-3, при этом область МДГ-2 представлена в виде трех зон активности, а МДГ-3 – две зоны активности. В опытной серии при инкубации с бензилпенициллина натриевой солью с содержанием 10 и 40 мг/г биомассы число активных зон МДГ-1 и МДГ-2 становится равным двум, а МДГ-3 – трем. При инкубации бензилпенициллина натриевой соли в концентрации 70 мг/г биомассы МДГ-2 выявлена в виде одной активной зоны.

По истечении суток в контроле для ампициллина и в образце с концентрацией ампициллина 10 мг/г биомассы определены две МФ фермента – МДГ-2 и МДГ-3, при этом область МДГ-2 представлена одной активной зоной, а МДГ-3 – двумя зонами активности. В других пробах обе МФ представлены двумя зонами активности.

Таким образом, возникновение большего числа активных зон фермента в зависимости от концентрации антибиотиков и времени инкубации соответствуют литературным данным об их связи с растущим количеством метаболитов [3].

Полученные сведения о структуре и изменении активности МДГ могут быть использованы для биотестирования вод, содержащих в качестве загрязнителей фармацевтические вещества, в частности, антибиотики пенициллинового ряда.

Литература:
1. Шаталаев И.Ф., Телитченко М.М., Чистяков Н.Е., Калинин И.В. Способ технологического контроля в процессе биологической очистки сточных вод на городских станциях аэрации // Патент России № 2014596.1994.
2. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
3. Телитченко М.М., Шаталаев И.Ф., Волгина Т.Б. Динамика молекулярных форм лактат-, малат- и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ в моделях экосистемы активного ила// Гидробиологический журнал. – 1992. – т.28. – № 3. – С. 32-39.

COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECT OF TWO PENICILLIN ANTIBIOTICS ON THE MALATE DEHYDROGENASE OF ACTIVATED SLUDGE.

Mashchenko Z. E[1]., Maslova E. V.[1], Rastsvetova N.V.[2], Shatalaev I. F.[2]

[1] Samara state technical University, Samara, Russia 443100, Samara, Kuibysheva str., 152
e-mail: mzinaida@yandex.ru
[2] Samara state medical University, Samara, Russia

A comparative study of the effect of antibiotic penicillin on the activity of malate dehydrogenase activated sludge. The dependence of the composition of molecular forms of the enzyme the incubation time and concentration of antibiotics.

Key words: malate dehydrogenase; activated sludge; benzylpenicillin sodium salt; ampicillin.

Health and well-being of man is in close relationship with the environment, including water resources. Currently there is a significant increase of environmental pollution with antimicrobials, due to widespread use of these agents in medicine and veterinary. Antibiotics presented in waste waters of cities and industrial enterprises are potentially dangerous pollutants. In modern plants biological methods of sewage treatment are widely used, in particular purification of the active sludge. It is advisable to assess their impact on microorganisms of activated sludge. The composition and dynamics of molecular forms (MF) of activated sludge malate dehydrogenase (MDH) can be used as a bioindication method[1].

The purpose of the study was to evaluate the influence of penicillin antibiotics (benzylpenicillin sodium salt and ampicillin) on the composition of molecular forms of activated sludge malate dehydrogenase.

In the experiments activated sludge from treatment facilities in the city of Samara was used. Incubation was carried out for 24 hours. Sampling for the determination of MF, the MDT was performed after 1 and 24 hours. Antibiotics concentration was varied at 10, 40 and 70 mg/g of biomass. MF MDHs was determined by electrophoresis in 7.5% polyacrylamide gels (electrode buffer – Tris-EDTA-borate buffer pH of 9.2). Identification of isoforms of MDH was performed using phenazinmetasulfattetrazolium reactions [1,2].

In the first hour of incubation in control and experimental series with benzylpenicillin sodium salt at a concentration of 10 and 40 mg/g identified two MF of the enzyme MDH-1 and MDH-3 were identified, and there were two active zones in the experience in the field of MDG-3. In the sample with the concentration of antibiotic 70 mg/g MDG-2 in the form of two zones of activity was identified.

In the first hour of incubation in control and experimental series with ampicillin two MF of the enzyme MDH-2 and MDH-3 were discovered. In the area of MDG-3 there were two active zones. In the sample with the concentration of antibiotic 70 mg/g of biomass sludge, the MDT-2 also has two active zones.

At the end of the day to control for benzylpenicillin sodium salt three MF – MDH-1, MDH-2 and MDH-3 were identified, with three activity zones in the area of MDG-2, and two areas of activity for MDH-3. In the experimental series by incubation with benzylpenicillin sodium salt with a content of 10 and 40 mg/g of biomass, the number of MDH-1 and MDH-2 active zones was equal to two, and MDH-3 – to three. The MDH-2 was identified as one active zone for sample of incubation with benzylpenicillin sodium salt at a concentration of 70 mg/g of biomass,.

At the end of the day to control for ampicillin and the sample concentration ampicillin 10 mg/g of biomass two MF of the enzyme MDH-2 and MDH-3 were defined, with the area of MDG-2 is represented by a single active area, and MDH-3 – two zones of activity. In other samples, both MF were presented of two zones of activity.

Thus, the emergence of the more active areas of the enzyme depends on the concentration of antibiotics and incubation time. This data corresponds to the literature data about their relationship with the growing number of metabolites [3].

The information obtained about the structure and changes in the activity of MDH can be used for biotesting of water containing as contaminants of pharmaceutical substances, in particular, the antibiotic penicillin.

References:
1. Shatalaev I. F., Telitchenko M. M., Chistyakov N. E. Kalinin I. V. Method of process control during the biological purification of wastewater in the urban aeration plants // Patent of Russia № 2014596.1994.
2. Korochkin L. I., Serov O. L., Pudovkin, A. I., Genetics of isoenzymes. M.: Nauka, 1977. 275 p.
3. Telitchenko, M. M., Shatalaev I. F., Volgina T. B. Dynamics of molecular forms of lactate, malate and glucose-6-fosfatdegidrogenaza in models of ecosystem of activated sludge// Hydrobiological journal. – 1992. – T. 28. – No. 3. – P. 32-39.

УДК 697.9

К ВОПРОСУ О ВНЕДРЕНИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ОХЛАЖДЕНИЯ ВОЗДУХА

Гулевский В.А., Шацкий В.П.

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия
394087, Воронеж, ул. Тимирязева, 1
e-mail: gulevsky_va@inbox.ru

Разработаны экологически чистые кондиционеры водоиспарительного принципа действия. Построены адекватные математические модели физических процессов, позволяющие определять параметры и режимы работы предлагаемых устройств.

Ключевые слова: водоиспарительное охлаждение; кондиционирование.

В современных требованиях, предъявляемых к строительству и модернизации зданий и сооружений различного типа, особое внимание уделяется вопросу их экологической безопасности. Существенным фактором, влияющим на жизнедеятельность и здоровье человека, является состояние воздушной среды помещений. Для ее нормализации в настоящее время широко применяется кондиционирование воздуха, позволяющее наряду с созданием оптимальных температур, проводить его очистку и увлажнение. Однако, установки для кондиционирования, как правило, не всегда отвечают современным вопросам экологической безопасности из-за применяемого в них фреона. Еще в конце 80-х годов был принят «Монреальский

протокол по веществам, разрушаю¬щим озоновый слой», предусматривающий постепенное сокращение производства и по¬требления ряда хлорфторуглеродов. Таким образом, проблема разработки и внедрения экологически чистых кондиционеров воздуха является весьма актуальной и включена в комплексную программу развития биотехнологий в РФ на период до 2020 года.

Мировая практика показывает, что в последнее десятилетие все большее внимание уделяется вопросу охлаждения воздуха водоиспарительными охладителями, которые не только просты как по конструкции, так и в эксплуатации, обладают низкой потребляемой мощностью, но и экологически безвредны, так как рабочим телом в них является вода. Представленные на рынке охладители, как правило, малоэффективны из-за низкой глубины охлаждения, которая обусловлена их конструктивными параметрами.

Для устранения этих недостатков понадобилось математическое моделирование физических процессов, которое однозначно показало преимущество пластинчатых охладителей, в которых движение воздуха организовано по вертикальным каналам. Предлагаемые нами математические модели [1], проверены на их адекватность и позволяют оценить геометрические и режимные параметры работы охладителя исходя из начальных температурно-влажностных значений воздушной среды и их целевых параметров. На основе представленных моделей спроектированы и изготовлены установки для охлаждения воздуха [2], позволяющие снижать его температуру в диапазоне от 5 до 15оС. При этом относительная влажность охлажденного воздуха и холодопроизводительность установок может регулироваться режимными параметрами их работы, что в подавляющем большинстве случаев позволяет достичь их необходимых значений, позволяющих сформировать требуемые параметры воздушной среды помещения.

Литература:
1. *Gulevsky V.A. Joint modelling of heat and mass transfer and aerodynamic process in evaporative water coolers // Scientific Herald of the Voronezh State University of Architecture and Civil Engineering. Construction and Architecture. 2012. № 3. C. 26-32.*
2. *Гулевский В.А. Нормализация температурно-влажностных параметров воздушной среды птицеводческих помещений путем обработки воздуха пластинчатыми теплообменниками: дис… докт.техн, наук – Воронеж, 2015. – 327 с.*

UDK 697.9

THE ISSUE OF ENVIRONMENTALLY FRIENDLY TECHNOLOGY AIR COOLING

Gulevsky V.A., Shatsky V.P.

Voronezh State agricultural University named after Emperor Peter I, Voronezh, Russia.
394087, Voronezh, Michurina st, 1
e-mail: gulevsky_va@inbox.ru

Developed environmentally friendly air conditioners water evaporation principle of operation. Built adequate mathematical models of physical processes, allowing to define the parameters and modes of operation of the proposed devices.

Key words: water evaporation cooling; air conditioning.

Modern requirements for the construction and modernization of buildings and structures of various types, special attention is paid to the issue of environmental safety. A significant factor affecting the life and health of a person is the condition of the air environment of premises. Its normalization is currently widely used air conditioning that allows along with the creation of optimal temperature, clean it and moisture. However, installation for air conditioning, as a rule, do not always meet modern environmental safety due to the applied refrigerant. Back in the late 80-ies adopted the «Montreal Protocol on substances that Deplete the ozone layer», providing for a gradual reduction in the production and consumption of a number of chlorofluorocarbons. Thus, the problem of development and implementation of environmentally friendly air-conditioning is highly relevant and included in the comprehensive program of biotechnology development in the Russian Federation for the period up to 2020.

World practice shows that in the last decade, more attention is paid to cooling water evaporation coolers that are not only simple both in design and in operation, low power consumption, but also environmentally friendly, as working fluid in them is water. On the market chillers usually ineffective because of the low depth of cooling, which

due to their design parameters.

To address these shortcomings needed mathematical modeling of physical processes, which clearly showed the advantage of plate coolers in which air movement is organized along the vertical channels. Our proposed mathematical model [1], tested for their adequacy, and assess the geometric and operating parameters of the chiller based on the initial temperature and humidity values of the air environment and targets. Based on the models designed and manufactured units for air cooling [2], allowing to reduce its temperature in the range from 5 to 15°. The relative humidity of the cooled air and the cooling capacity of the unit may be governed by regime parameters of their work that the vast majority of cases allows to achieve their required values, allowing to form the required parameters of the air environment of the room.

References:

1. *Gulevsky V.A. Joint modelling of heat and mass transfer and aerodynamic process in evaporative water coolers // Scientific Herald of the Voronezh State University of Architecture and Civil Engineering. Construction and Architecture. 2012. № 3. C. 26-32.*
2. *Gulevsky V. A. Normalization of temperature and humidity parameters of the air environment of poultry facilities through air handling systems plate heat exchangers: dis... doctor.engineering, Sciences – Voronezh, 2015. – 327 p.*

.....

УДК574.64:597.442

ОТРАБОТАННЫЕ СМАЗОЧНЫЕ МАСЛА В СТОЧНЫХ ВОДАХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ И БИОТЕХНОЛОГИЯ ИХ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ

Ганиев И.М., Морозов Н.В., Иксанова А.Г.

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,
420008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18. e-mail: ksu@mail.ru

Разработана биотехнологическая схема очистки сточных вод, загрязненных минеральными, полусинтетическими и синтетическими маслами на основе управляемого применения отселектированных углеводородокисляющих микроорганизмов специально созданном для этой цели струйно-отстойном биоректоре непрерывного действия и работающая в изменяющихся условиях среды.

Ключевые слова: отработанные смазочные масла; обезвреживание; струйно-отстойный биоректор; биотехнологическая схема; консорциум.

Сельскохозяйственная и автомобильная техника потребляет большое количество смазочных масел, которые в процессе работы ухудшают свои эксплуатационные показатели и в результате становятся непригодными для использования по прямому назначению (Коваленко В. П., Турчанинов В. Е., 1990 и др.). Надлежащая рекуперация или утилизация их для решения народнохозяйственных задач до сегодняшнего дня не разработаны. В силу этих и других причин основное количество отработанных смазочных масел отводится в окружающую природную среду неся колосальный урон водным и земельным ресурсам.

Известны разнообразные способы очистки производственных сточных вод от нефти и отработанных смазочных масел: отстой, фильтрация, коагуляция, флотация и биохимическое окисление.

Одним из приемлемых путей решения данной проблемы является разработка технологических схем глубокой очистки и доочистки маслосодержащих стоков, основанных на применении консорциума или ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов. Именно микроорганизмы с большой лабильностью метаболизма, превращают сложные вещества в самые простые соединения, т.е. в H2O, CO2, H2.

Целью настоящей работы явилось создание приемлемого оборудования, а на ее основе технологической схемы глубокой очистки и доочистки производственных маслосодержащих сточных вод с использованием вновь выбранного консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ).

Испытан струйно-отстойный биореактор (СОР) колонного типа вмонтированным струйным элементом, обеспечивающий распыление сточной жидкости до дисперстного состояния с образованием большой поверхности контакта загрязнений (поступающей со стоящей жидкостью), участвующий в очистки воды УОМ.

В очистке подвержена сточная вода Технополиса АО «Химград» г. Казань следующего состава: ХПК 630-2500 мг/дм3, в том числе O2 в пределах 3-6 мг/дм3, сумма неорганических форм азота (NH-4, NO-3,

NO-2) 50 мг, фосфор (P2O5) – 10 мг, нефтепродукты до 250 мг/дм3. Средняя численность УОМ на входе в СОР от 100×10-6–150×10-6 кл/см3. Режим очистки стока в СОР принят непрерывный, длительность биоокисления 0,8; 1; 1,2; 1,4; 2; 3; 4 часа.

На первом этапе работы нами было выявлено, что оптимальное время пребывания стоков СОР приближается к 1,2-1,3 ч., что соответствует скорости подачи сточной воды в СОР 8-10 л/мин.

Включение в технологическую схему второго СОР, сохраняя последовательность поступления сточной жидкости из первой во вторую ступень и увеличения времени контакта микроорганизмов с остаточными углеводородами (оставшиеся неокисленными в первой ступени) от 0,5 до 1 часа, с сохранением тех же параметров очистки, степень обезвреживания сточной жидкости от искомого загрязнения достигает 94-96%. По сути биотехнологическая схема очистки, включающая первичную подготовку сточной жидкости механическим способом (сбор, отстой осветление) и далее управляемая биодеструкция с УОМ в двух ступенях СОР (скорость потока 0,12-0,17 мг/дм3, температура 18-22 °С и длительность пребывания 1,5-2 часа) позволяет очистить от углеводородов нефти до санитарных норм – 0,16 мг/л, то есть до норм оборотного водоснабжения. В условиях дефицита пресной воды, используемой в производственном процессе Технополиса АО «Химград» г. Казань, разработанная биотехнологическая схема с использованием бактериального консорциума, обеспечивает полноту рекуперацию обработанных вод в предприятии.

Литература:
1. Коваленко В. П., Турчанинов В. Е. Очистка нефтепродуктов от загрязнений / В. П. Коваленко, В. Е. Турчанинов // М.: Химия, 1990. – 158 с.

UDK574.64: 597,442

USED LUBRICATION OIL IN THE WASTEWATER OF INDUSTRIAL ENTERPRISES AND BIOTECHNOLOGY THEIR DISPOSAL

Ganiev I. M., Morozov N. In. Iksanova A. G.

FGAOU VPO «Kazan (Volga) Federal University»
420008, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, Kremlyovskaya St., 18. e-mail: ksu@mail.ru

The scheme developed by the biotechnological treatment of waste waters polluted with mineral, semi-synthetic and synthetic oils on the basis of the managed application atzelektronik hydrocarbon-oxidizing microorganisms specially created for this purpose, a jet-settling together, continuous, and working in a changing environment.

Key words: waste lubricating oil; disposal; jet-settling together; biotechnological scheme; a consortium.

Agricultural and automotive equipment consumes a large amount of lubricating oils that are in the process impair their performance and result become unusable for its intended purpose (Kovalenko V. P., Turchaninov, V. E., 1990, etc.). Proper recycling or disposal of them to solve economic problems until today has not been developed. For these and other reasons, the basic amount of used lubricant oil is discharged into the environment carrying a huge damage to water and land resources.

There are a variety of methods for purifying industrial waste water from oil and waste lubricating oil: sludge, filtration, coagulation, flotation and biochemical oxidation.

One of the acceptable ways of solving this problem is the development of technological schemes of deep cleaning and purification of oil-containing wastewater based on the use of consortium or Association of oil-oxidizing microorganisms. It is the microorganisms with a high lability of metabolism, transform complex substances into simple compounds, i.e. H2O, CO2, H2.

The aim of this work was the establishment of the acceptable equipment, and on its basis the technological scheme of deep purification and purification of oil-containing industrial waste water using newly selected consortium of hydrocarbon-oxidizing microorganisms (HOM).

Tested jet-settling the bioreactor (JSB) column type mounted spray element for spraying waste liquid to dispersing state with the formation of a large contact surface contamination (coming from the standing liquid), involved in water purification HOM.

Cleaning exposed to waste water of AO Technopolis «Himgrad», Kazan the following composition: COD 630-2500 mg/dm3, including O2 in the range 3-6 mg/dm3, the amount of inorganic forms of nitrogen (NH-4, NO-3, NO-2) 50 mg, phosphorus (P2O5) – 10 mg, petroleum products up to 250 mg/dm3. The average number of HOM at the

entrance to the JSB from 100×10-6-150×10-6 C/cm3. Mode drain cleaning in JSB adopted continuous, the duration of the bio-oxidation 0.8; 1; 1.2; 1.4; 2; 3; 4 hours.

In the first phase of work we identified that the optimum time of stay of wastewater JSB approaching 1.2 to 1.3 h, which corresponds to the feed rate of the waste water in a JSB of 8-10 l/min.

The inclusion in the technological scheme of the JSB, keeping the sequence of receipt of the waste fluid from the first to the second stage and increase the contact time of microorganisms with the residual hydrocarbons (the remaining unoxidized in the first stage) from 0.5 to 1 hour, keeping the same treatment parameters, the degree of neutralization of the waste liquid from the desired pollution reaches 94-96%. In fact biotechnological purification scheme, which includes the initial preparation of sewage by mechanical means (collection, sludge clarification) and further controlled Biodegradability with the JSB in two steps of HOM (flow rate of 0.12-0.17 mg/dm3, temperature 18-22 °C and the duration of stay 1.5-2 hours) allows you to clean from the petroleum hydrocarbons to sanitary standards – 0.16 mg/l, that is, to norms of water recycling. The shortage of fresh water used in the production process of AO Technopolis «Himgrad», Kazan, developed by the biotechnological scheme using bacterial consortium, provides a complete recovery of the treated water in the plant.

References:
1. Kovalenko V. P., Turchaninov, V. E. Cleaning oil from impurities / V. P. Kovalenko, E. V. Turchaninov // M.: Chemistry, 1990. – 158 p.

УДК 602-027.236, 602-7; 663.1, 502.175; 504.5/.6

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ РАБОТЫ ПЕРЕМЕШИВАЮЩЕГО УСТРОЙСТВА – АЭРАТОРА НА БИОРЕМЕДИАЦИЮ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

Заборская О.Ю.[1], Крамм Э.А.[1], Заборская А.Ю.[2]

[1]ФГБОУ ВО «Московский политехнический университет», Москва, Россия
105066, г. Москва, ул. Старая Басманная, дом 21/4.
e-mail: o_za@mail.ru
[2]ГБОУ Городской методический центр, Москва, Россия
109044, г. Москва, ул. Воронцовская, д. 6А стр.1
e-mail: a.zaborskaia@yandex.ru

Изучен процесс окисления углеводородов в почве с аэрацией сателлитной мешалкой-аэратором. Были получены данные по динамике окисления углеводородов в почве при различных режимах перемешивания и затратам энергии на проведение процесса.

Ключевые слова: нефтезагрязнения, мешалка-аэратор, биоремедиация, почвы, аэрация

Для аэробных микроорганизмов одним из важнейших факторов, влияющих на их жизнедеятельность, является кислород. Процесс естественной аэрации почвы обусловлен особой пористой структурой самой почвы и зависит от высоты слоя почвы и в более глубоких слоях затруднен.

Для интенсификации процессов, осуществляющихся в ходе жизнедеятельности аэробных микроорганизмов, возможно применение принудительной аэрации почвы. С этой целью разработаны специальные приспособления – мешалки-аэраторы различных типов. Процесс проводили в биореакторе открытого типа. Насыщение почвы кислородом – аэрация, происходит при перемешивании с помощью мешалки-аэратора в определенном режиме. Варьирование режимов позволяет сэкономить электроэнергию.

Непрерывный режим – использование одного режима работы на протяжении всего процесса. Интераптный – прерывистый режим работы, чередование режимов работы с заданной частотой на протяжении всего процесса.

Исследовались: – непрерывный режим аэрирования 8 часов; – 30 мин аэрирования – 30 мин выстоя; – 15 мин аэрирования – 45 мин выстоя.

Потеря эффективности потребления загрязнителя обусловлена недостаточной аэрацией и кислородным голоданием части микрофлоры почвы.

Таким образом, необходим подбор режима, при котором минимальное время перемешивания обеспечит проведение процесса без потери эффективности потребления загрязнителя. При этом нужно помнить, что в момент пуска-остановки происходит скачок потребления электроэнергии. То есть, режим 30 мин работы аэратора – 30 минут выстоя почвы будет энергетически более выгоден, чем 5 мин работы аэратора – 5 мин выстоя почвы, хотя в течение часа соотношение времени аэрирования и выстоя будут равны в обоих случаях.

INFLUENCE OF OPERATING MODES OF MIXING DEVICE – AERATOR ON PETROPOLLUTED SOILS BIOREMEDIATION

Zaborskaya O.Y.[1], Kramm E.A.[1], Zaborskaya A.Y.[2]

[1]Moscow polytechnic university, Moscow, Russia
Moscow, 105066, Staraya Basmannaya St., 21/4
e-mail: o_za@yandex.ru
[2]City methodic center, Moscow, Russia
Moscow, 109044, Vorontsovskaya St., 6 A 1
e-mail: a.zaborskaia@yandex.ru

Process of hydrocarbons oxidation in the soil with aeration by a satellite mixer aerator is studied. Data on dynamics of hydrocarbons oxidation in the soil in case of hashing various modes were obtained and energy costs for carrying out process.

Key words: petropollution, mixer-aerator, bioremediation, soil, aeration

Oxygen is one of the major factors influencing aerobic microorganisms' activity. Process of soil natural aeration is caused by special soil porous structure and depends on layer height and in deeper layers is complicated.

For an intensification of the processes which are carried out during activity of aerobic microorganisms' application of constrained soil aeration is possible. Special devices – mixers-aerators of various types are developed for this purpose. Process was carried out in bioreactor of open type. Oxygen saturation of the soil – aeration, happens when hashing by means of a mixer aerator in a certain mode. The modes variations allow saving the electric power.

Continuous mode – use of one operating mode throughout all process. Interrupted – an intermittent operating mode, alternation of operating modes with the set frequency throughout all process.

Were researched: – continuous mode of 8 hours aeration; – 30 minutes aeration – 30 minutes motion dwell; – 15 minutes aeration – 45 minutes motion dwell.

Pollutant consumption efficiency loss is caused by insufficient aeration and oxygen corporal of soil microflora part.

In that case, choice of the mode which provides minimum time of hashing will carrying out process without loss of pollutant consumption efficiency is necessary. At the same time it is necessary to remember that at the start-up and stop time there is an electricity consumption jump. That is, the mode of 30 minutes operation of the aerator – motion dwell soils will be energetically more profitable 30 minutes, than 5 minutes operation of the aerator – 5 minutes motion dwell soils though within an hour a ratio of time of aeration and motion dwell will be equal in both cases.

.....

УДК 621.039.75

ФИНАНСОВО-ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕАЛИЗАЦИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИНВЕСТИЦИОННЫХ ПРОЕКТОВ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СФЕРЕ НА ПРИМЕРЕ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕДУР РЕГИСТРАЦИИ ОБЪЕКТОВ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ДЛЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЙ

Раткин Л. С.

ООО «АРГМ», Москва, Россия
119049, Москва, Ленинский проспект, д. 4, стр. 1А
e-mail: rathkeen@bk.ru

Рассмотрены финансово-экономические аспекты реализации экологических инвестиционных проектов. Особое внимание уделено биотехнологической продукции, выпускаемой по инвестпроектам. Показано, как оптимизация регистрационных процедур для объектов интеллектуальной собственности энергетических предприятий повышает экономическую эффективность производств.

Ключевые слова: финансово-экономические параметры, экология; инвестиционные проекты; биотехно-

логии; интеллектуальная собственность; энергетические предприятия.

При реализации экологических инвестиционных проектов в сфере биотехнологий с участием российских и зарубежных инвесторов для улучшения финансово-экономических параметров производств энергетических предприятий предлагается разработанный комплекс организационных и экономических методов, предполагающий оптимизацию процедур регистрации объектов интеллектуальной собственности, в т.ч., наиболее часто востребованных групп – изобретений, полезных моделей, промышленных образцов и товарных знаков. Реализация разработанного комплекса позволила автору получить порядка 160 свидетельств о регистрации прав на объекты интеллектуальной собственности, в настоящее время процесс оформления прав продолжается.

Менеджмент (организационные методы), в частности, включают налаженное взаимодействие с соисполнителями работ по каждому экологическому инвестиционному проекту в биотехнологической сфере (в т.ч., с потенциальными и стратегическими инвесторами, предприятиями и органами государственного управления), учёт и реализацию их требований по регистрации объектов интеллектуальной собственности с составлением порядка приоритета их регистрации. Работа с представителями регистрационных компаний предполагает участие в переговорах представителей биотехнологических и энергетических предприятий с потенциальными инвесторами и соисполнителями. При реализации экологических инвестиционных проектов в биотехнологической сфере производится регулярная корректировка показателей выполнения проекта. Также обновляется информации по биотехнологической продукции и сопоставляются значения характеристик с наиболее близкими российскими и зарубежными аналогами.

Маркетинг (экономические методы), в т.ч., включает моделирование рынка сбыта биотехнологической продукции (и услуг) энергетических предприятий по каждому экологическому инвестиционному проекту, моделирование поведения рынка экологических инвестиционных проектов энергетических предприятий на ближайшую и среднесрочную перспективу, построение моделей активности энергетических предприятий и их подразделений для повышения качества расчетов и уровня проработанности экологических инвестиционных проектов и выделение расширенного набора базовых и ключевых показателей по каждому экологическому инвестиционному проекту энергетического предприятия для повышения его инвестиционной привлекательности для конкретного инвестора с учетом требований заказчиков биотехнологической продукции.

Результатом внедрения разработанного комплекса, помимо получения 160 свидетельств о регистрации прав на объекты интеллектуальной собственности, стало также создание базы данных оценки эффективности реализации экологических инвестиционных проектов в биотехнологической сфере для энергетических предприятий по разным странам с учетом особенностей национального законодательства с сфере интеллектуальной собственности. Международная научно-инновационная организация «ECOENERGY» наградила разработку Золотой медалью «Никола Тесла».

FINANCIAL AND ECONOMICAL ASPECTS OF REALIZATION OF ECOLOGICAL INVESTMENT PROJECTS IN THE FIELD OF BIOTECHNOLOGY ON EXAMPLE OF OPTIMIZATION OF PROCEDURES OF REGISTRATION OF OBJECTS OF INTELLECTUAL PROPERTY FOR ENERGY ENTERPRISES

Rathkeen Leonid. S.

«ARGM» LLC, Moscow, Russia
119049, Moscow, Leninsky prospect, bldg. 4, 1A
e-mail: rathkeen@bk.ru

The financial and economical aspects of realization of ecological investment projects are discussed. Most attention is paid for biotechnological products produced by investment projects. Also are discussed the questions of optimization of registration procedures for objects of intellectual property of energy enterprises for increasing of economical efficiency of industry.

Key words: financial and economical parameters; ecology; investment projects; biotechnologies; intellectual property; energy enterprises.

For realization of ecological investment projects in the field of biotechnologies with the participant of Russian and foreign investors for increasing of financial and economical industrial parameters of energy enterprises is proposed the developed complex of administration and economical methods, which suggests the optimization of procedures of registration of objects of intellectual property including the most profitable groups – inventions, useful modes, industrial models and trade marks. The realization of developed complex assists for the author to receive about 160 certificates on objects of intellectual property, now this process is continued.

Management (organization methods), also includes cooperation with the agents by every ecological investment project in the field of biotechnology (potential and strategic investors, enterprises, state control etc), registration of objects of intellectual property with the forming of priority list for its registration. Work with the representatives of registration companies also includes the participant in talks of representatives of biotechnological and energy enterprises with the potential investors and agents. During realization of ecological investment projects in the field of biotechnologies the parameters of projects realization are regularly corrected. Also regularly is refreshed the information about biotechnological products and its characteristics are compared with the parameters of the most nearest Russian and foreign analogies.

Marketing (economical methods), also includes modeling of the market of biotechnological products (and services) of energy enterprises for every ecology investment projects, modeling of market of ecological investment projects of energy enterprises on the nearest and medium-size perspective, constructing of models of activity of energy enterprises and its subdivisions for increasing of quality of calculating and level of design of ecological investment projects and defining the enhanced set of base and key parameters for every ecological investment project of energy enterprise for increasing of investment profitable for investors according the specifications of biotechnological products.

The result of realization of developed complex, as the receiving of 160 certificated of right registration on intellectual property objects, also became the creation of database of efficiency of realization of ecological investment projects in the field of biotechnologies for energy enterprises for different countries according the features of national laws in the field of intellectual property. International scientific and innovation organization «ECOENERGY» award the author for this work by Gold Medal «Nikola Tesla».

УДК 628.355.2

БИОМАТЕМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД ЭКСПРЕСС-КОНТРОЛЯ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССОМ БИООЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Балымова Е.С., Ахмадуллина Ф.Ю., Закиров Р.К., Девятко В.С., Захаров В.В.

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия
420015, Казань, ул. Карла Маркса, д. 68,
e-mail: ilc2013@inbox.ru

Разработан экспресс-метод контроля для управления процессом биологической очистки сточных вод на основе биодиагностики активного ила с последующей математической обработкой.

Ключевые слова:активный ил, биоматематический подход, уравнение регрессии.

Непостоянство состава и расхода сточных вод, содержание в них токсичных и биорезистентных поллютантов обусловливает недостаточную эффективность действующих очистных сооружений. Это диктует необходимость организации и внедрения в практику высокочувствительной и информативной системы технологического экспресс-контроля, особенно в процессе биологической очистки, зависящего от состояния активной биомассы [1].

В работе разработан экспресс-метод контроля для управления процессом биоочистки сточных вод (на примере ПАО «КазаньОргсинтез») на основе биодиагностики активного ила, функционирующего в изменяющихся условиях его формирования и математической обработки результатов биомониторинга.

Рассмотрены различные вариации условий формирования активного ила, включая внештатные ситуации, связанные с воздействием одного, двух и совокупности всех контрольных стрессоров, характерных для изучаемого процесса водоочистки (фенол, нСПАВ, гликоли, нагрузки). Выбор эмпирико-статистической модели в виде полиномиальной зависимости второго порядка функции нескольких переменных: Error! Not a valid embedded object.,где y – количественная оценка состояния активного ила в определенный временной интервал процесса БОВ, баллы; x1 – исходное состояние биоагента, баллы; x2-5 – концентрации приоритетных экофакторов, мг/дм3; x6 – продолжительность аэрации, ч; был обусловлен сложностью

изучаемой экосистемы и возможностью полиномиальных зависимостей обеспечить качественную интерполяцию широкого набора различных данных [2].

Графическая интерпретация полученного уравнения регрессии для системы фенол – исходное состояние активного ила (в качестве примера) представлена на рис. 1.

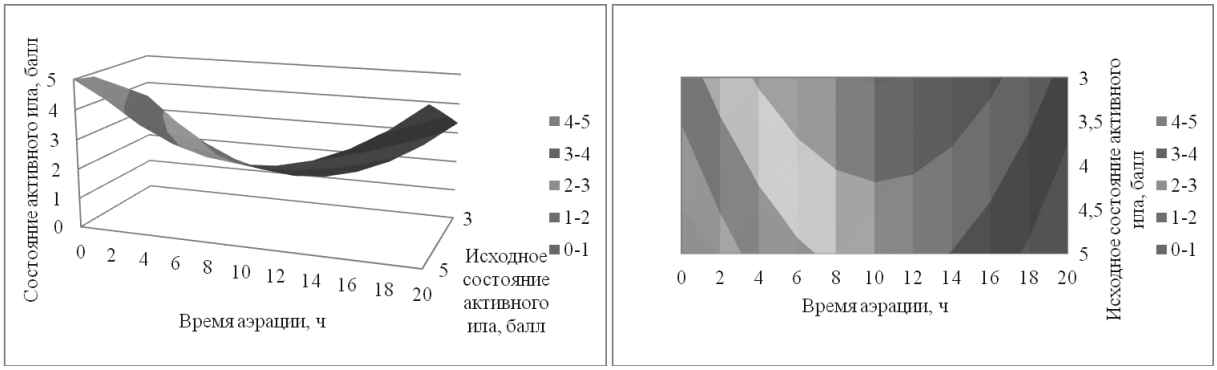


Рис. 1 – Поверхность (а) и проекция (б) поверхности на плоскость функции состояния активного ила в динамике в зависимости от его исходного состояния при концентрации фенола в сточной воде 5 мг/дм3

Схема осуществления экспресс-контроля состояния активного ила в производственных условиях предполагает на основании текущего аналитического контроля сточных вод и состояния активного ила определение его восстановительного потенциала по полученному уравнению регрессии. При величине восстановительного потенциала менее 80% предполагается проведение мероприятий по обеспечению экологической безопасности функционирования действующих очистных сооружений.

Таким образом, биоматематический подход позволяет получить управляющую программу, которая может служить практическим руководством действий персонала при изменении условий функционирования очистных сооружений, так как позволяет оценить как состояние активного ила в процессе водоочистки, так и его восстановительный потенциал, и, тем самым, прогнозировать эффективность биоочистки сточных вод.

Литературы:
1. *Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. 512с.*
2. *Шитиков В.К., Розенберг Г.С., Зинченко Т.Д. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2003. 463с.*

.....

UDC 628.355.2

BIOMATHEMATICAL METHOD OF EXPRESS – MONITORING FOR WASTEWATER TREATMENTPROCESS

Balymova Ye.S., Akhmadullina F.Yu., Zakirov R.K., Deviatko V.S., Zakharov V.V.

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia
420015, Kazan, Karl Marks St., 68,
e-mail: ilc2013@inbox.ru

Express- method to controll the process of biological wastewater treatment developed. It based on biodiagnostics of activated sludge followed by mathematical processing.

Key words: activated sludge, biomathematical approach, regression equation.

Variability of composition and flow of waste water, the content of the toxic and bio-resistant pollutants causes insufficient efficiency of existing wastewater treatment plants. This dictates the need for the organization and implementation in practice of the highly sensitive and informative system of rapid technological control, especially

in the biological treatment process, depending on the active state of the biomass [1].

The paper developed a rapid method of control for process control of waste water treatment (for example, PJSC «KazanOrgsintez») based on the activated sludge biodiagnostics functioning under changing conditions of its formation and mathematical processing of biomonitoring results.

Different variations of the conditions of activated sludge formation, including abnormal situations associated with exposure to one, two or all together control the stressors specific to the studied process of water purification (phenol, nonionic surfactants, glycols, load). The choice of empirical statistical model in the form of a polynomial dependence of the second order function of several variables: Error! Not a valid embedded object., where y- a quantitative assessment of the activated sludge state in a certain time interval biological treatment process, points; x1 – initial state of biological agent, points; x2-5 – the concentration of priority environmental factors, mg/l; x6 – the duration of aeration, h; was due to the complexity of the studied ecosystem and the possibility of polynomial interpolation dependencies to provide quality range of different data [2].

Graphical interpretation of the regression equation for the system phenol – the initial state of the activated sludge (as an example) is shown in Fig. 1.

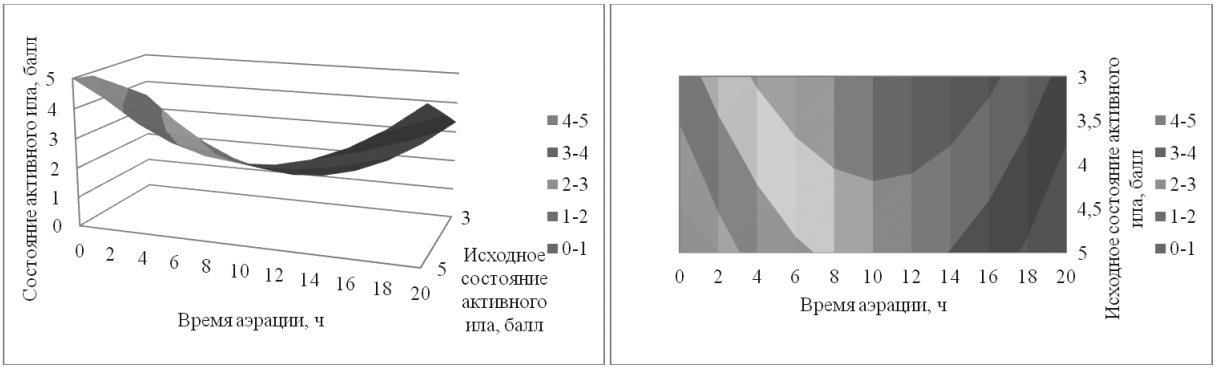


Fig. 1 Surface (a) and the projection (b) to the plane surface of the state function in the dynamics of the activated sludge according to its original state when the phenol concentration in the waste water 5 mg / l

The scheme of the express control of the state of the activated sludge in a production environment requires based on the current analytical control of sewage and activated sludge state to determine its reduction potential obtained by the regression equation. When the value of the reduction potential of less than 80% is supposed to conduct measures to ensure environmental safety of the existing wastewater treatment plants.

Thus, bio-mathematical approach allows you to get a pilot program that can serve as a practical guide for staff when changing the operating conditions of sewage treatment plants, as it allows to evaluate both the state of the activated sludge in the water treatment and its reduction potential, and thus to predict the effectiveness of biological treatment of wastewater.

References:
1. *Zhmur N.S. Technological and biochemical processes of wastewater treatment plants with the aeration tanks. M .: AKVAROS, 2003. 512p.*
2. *Shitikov V.K., Rosenberg G.S., Zinchenko T.D. Quantitative hydroecology: system identification techniques. Togliatti: IEVB RAS, 2003. 463p.*

*УДК 630*165+630*181.5:58.085*

ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗАЩИТНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ IN VITRO ДЛЯ ПЛАНТАЦИОННОГО ЛЕСОВЫРАЩИВАНИЯ

Третьякова И.Н.[1], Пак М.Э.[1], Иваницкая А.С.[1], Шуклина А.С.[1], Садыкова В.С.[2], Рогозин Е.А.[3]

[1]Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, обособленное подразделение ФНЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия 660036, Красноярск, Академгородок, 50, строение 28
[2]ФГБНУ «НИИНА» имени Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

[3]ИБХ РАН Москва, Россия
e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Проводили исследование длительно культивируемых эмбриогенных культур Larix sibirica in vitro: морфогенез и созревание соматических зародышей, плоидность и генотипирование клеточных линий. Добавление антимикробных пептидов в среду АИ стимулировало рост регенерантов. Эмбриогенные клеточные линии составляют коллекционный банк для плантационного лесовыращивания.

Ключевые слова: Larix sibirica, антимикробные пептиды, соматический эмбриогенез.

Создание сортового плантационного лесовыращивания на основе биотехнологии соматического эмбриогенеза в культуре in vitro является одним из перспективных направлений (программа Multi-Varietal Forestry (Park et al 2014)). В основе методов лежит уникальная способность растительных клеток реализовывать при определенных условиях имеющуюся у них генетическую информацию и давать неограниченное количество высокопродуктивных, устойчивых к вредителям клонированных сеянцев.

Для запуска процесса соматического эмбриогенеза лиственницы вводили незрелые половые зародыши и мегагаметофиты, полученные от свободного опыления и контролируемого самоопыления на среду АИ (http://www.freepatent.ru /images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf). Переход вегетативных клеток на путь соматического эмбриогенеза сопровождался вытягиванием и поляризацией клеток, их асинхронным делением и образованием эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ), состоящей из глобулярных зародышей и суспензоров. В результате примененной технологии было получено 17 пролиферирующих клеточных линий (Кл) от трех деревьев-доноров. Возраст эмбриогенных культур составлял от одного года до семи лет. Число глобулярных соматических зародышей у разных Кл линий колебалось от 2040 до 11103 на 1 гр. ЭСМ. Соматические зародыши образовывали полиэмбриональные комплексы, в которых шла их активная мультипликация через кливаж, почкование и расщепление клеток суспензора. Мультипликация не прекращалась в течение семи лет наблюдений. Цитогенетическое исследование ЭСМ лиственницы сибирской показало, что плоидность длительно культивируемых культур не изменялась. Клетки оставались диплоидными. По данным микросателлитного анализа пролиферирующие клеточные линии лиственницы сибирской характеризовались слабой аллельной изменчивостью.

При добавлении в питательную среду АИ абсцизовой кислоты (АБК) шла гистодифференцировка и созревание соматических зародышей в течение 45 суток. Число созревших соматических зародышей составило 0,6–33% у разных Кл. Прорастание соматических зародышей происходило на безгормональной среде АИ в течение 14–21 дней. Добавление антимикробных пептидов в среду для прорастания стимулировало рост регенерантов и образования корней. Для адаптации регенеранты высаживали в искусственную почву в условиях ростовой камеры, а затем были переносились в теплицу, где клонированные сеянцы активно растут в течение четырех лет. Генотипирование сеянцев по микросателлитным локусам показало полное соответствие дереву–донору. Клонированные генетически стабильные сеянцы можно рекомендовать, как посадочный материал для плантационного выращивания лиственницы в Сибири.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках научного проекта № 15-04-01427 и № 16-44-240509.

*UDC 630*165+630*181.5:58.085*

APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY OF SOMATIC EMBRYOGENESIS SIBERIAN LARCH WITH PROTECTIVE ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN VITRO FOR PLANTATION FOREST GROWING

Tretyakova I.N.[1], Park M.E.[1], Ivanitskaya A.S.[1], Shuklina A.S.[1], Sadykova V.S.[2], Rogozhin E.A.[3]

[1]Sukachev Institute of Forest SB RAS, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS»
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50, building 28
[2]Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia
[3] Shemyakin and Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia
e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Long-term proliferating cell lines of Larix sibirica in vitro were studied: morphogenesis and maturation of somatic embryos, ploidy and genotyping cell lines. The addition of antimicrobial peptides to the culture medium AI stimulated

the growth of regenerates. Embryogenic cell lines constitute the collection bank for plantation forest growing.

Key words: Larix sibirica, antimicrobial peptides, somatic embryogenesis.

Creating high-quality plantation forest growing on the basis of biotechnology in somatic embryogenesis in vitro culture is one of the promising areas (program Multi-Varietal Forestry (Park et. al. 2014)). The method is based on the unique ability of plant cells to implement under certain conditions available to them the genetic information and give an unlimited number of high-yield, pest-resistant cloned seedlings.

To start the process of somatic embryogenesis of larch we injected immature sexual embryos and megagametophytes to the culture medium AI, this plant material obtained from free pollination and controlled self-pollination (http://www.freepatent.ru/images/ patents/5/2456344/patent-2456344.pdf). Conversion of vegetative cells on the path of somatic embryogenesis was accompanied by elongation and polarized cells, asymmetric cellular division and formation of embryonal suspensor mass (ESM), it consisted of globular embryos and suspensors. As a result of the application of this technology 17 proliferating cell lines (Cl) were derived from three tree-donors. Age embryogenic cultures ranged from one to seven years. The number of globular somatic embryos at different Cl ranged from 2040 to 11103 per 1 gram ESM. Somatic embryos formed polyembryonic complexes, in these complexes was their active multiplication through cleavage, budding and splitting cells suspensors. Multiplication did not stop within seven years of observations. Cytological analysis of Siberian larch ESM demonstrated that ploidy of long-proliferating embryogenic cell lines did not change. Cells were diploid. According microsatellite analysis proliferating cell lines of Siberian larch were characterized by a weak allelic variability.

Morphogenesis and maturation of somatic embryos to occur within 45 days, when added to the culture medium of abscisic acid (ABA). The number of mature somatic embryos was 0,6–33% in different Cl. Germination of somatic embryos occurred on medium AI without hormones within 14-21 days. The addition of antimicrobial peptides in the culture medium for the germination stimulated the growth and formation of roots regenerated. To adapt plantlets planted in artificial soil in a growth chamber and then were transferred to a greenhouse where cloned seedlings actively growing for four years. Genotyping seedlings at microsatellite loci showed full corresponds with the tree-donor. Cloned genetically stable seedlings can be recommended as planting material for plantation growing larch in Siberia.

The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research, Government of Krasnoyarsk Territory, Krasnoyarsk Region Science and Technology Support Fund to the research projects № 15-04-01427 и № 16-44-240509.

УДК: 550.4: 573.4:577.15:663.15

ГЕОХИМИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Ермаков В.В.[1], Ковальский Ю.В.[2]

[1] ФГБУН Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, 119991, Москва В-334, ул. Косыгина, 19; e-mail: ermakov@geokhi.ru
[2] АО «Государственный НИИ биосинтеза белковых веществ». Москва, Россия 109004, Москва, ул. Александра Солженицына, 27. E-mail: yukovalsky@mail.ru

Рассмотрены фундаментальные и прикладные вопросы геохимической экологии. Приведены примеры современных инноваций и технологий в области экологического мониторинга, профилактики биогеохимических эндемий и микроэлементозов.

Ключевые слова: геохимическая экология, микроэлементозы, животные, человек, биотехнологии

Геохимическая экология возникла на стыке естественных наук, являясь разделом биогеохимии и общей экологии [2]. Ее роль постоянно возрастает в связи с техногенным преобразованием биосферы и проникновением экологии и биотехнологии во все сферы жизнедеятельности человека [1].

В настоящее время геохимическая экология служит основой инноваций в области экологического мониторинга и диагностики микроэлементозов (использование морфометрических способов индикации, химического элементного состава волосяного покрова и других тканей животных, металотионеинов, ме-

таллоэнзимов, ферментной адаптации, технологии профилактики локальных и глобальных биогеохимических эндемий, ремедиации загрязненных почв и отвалов и др.).

Теоретические положения геохимической экологии являются базисом прогнозных оценок эволюции химического состава организмов, а также практических приложений в почвоведении, растениеводстве, микробиологии, животноводстве, медицине и биотехнологии [3].

Литература:
1. Ермаков В.В., Тютиков С.Ф. Геохимическая экология животных. - М.: Наука, 2008. - 315 с.
2. Ковальский В.В. Геохимическая экология: Очерки. - М.: Наука, 1974.- 299 с.
3. Gradova N., Ermakov V., Kovalsky Yu. The use of microbiological synthesis products for correction of microelementhoses // Ecologica. - 2013. - V. 20. - № 72. - P. 575-580.

UDC: 550.4: 573.4:577.15:663.15

GEOCHEMICAL ECOLOGY AND ITS SIGNIFICANCE IN BIOTECHNOLOGICAL RESEARCH

Vadim Ermakov[1], Yuri Kovalsky[2]

[1] FSFASci Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of RAS, Kosigin str., 19, V-334 Moscow119991, Russia; e-mail: ermakov@geokhi.ru
[2] PC «State Scientific Research Institute of Biosynthesis of Proteins». Alexander Solzhenitsyn, 27, Moscow 109004; e-mail: yukovalsky@mail.ru

The fundamental and applied problems of geochemical ecology are considered. The examples of nowaday innovations and technologies in the field of the environmental monitoring, prevention of biogeochemical endemic and microelementhoses are presented.

Ключевые слова: geochemical ecology, microelementhoses, animals, man, biotechnologies

Geochemical ecology originated at the intersection of the natural sciences as a part of biogeochemistry and general ecology [2]. Its role is constantly increasing due to the anthropogenic transformation of the biosphere and the penetration of ecology and biotechnology in all spheres of human activity [1].

Currently, geochemical ecology is the basis of innovation in the field of the environmental monitoring and diagnosis of microelementhoses (using morphometric methods of indication, chemical elemental composition of hair and other tissues of animals, metallothioneins, metalloenzymes, enzyme adaptation, the prevention technologies of local and global biogeochemical endemic, remediation of contaminated soils and waste dumps, etc.).

Theoretical principles of geochemical ecology is the foundation for predictive assessments of the evolution of the chemical composition of organisms as well as practical applications in soil science, crop production, microbiology, animal husbandry, medicine and biotechnology [3].

References:
1. Ermakov V.V., Tyutikov S.F..Geochemical Ecology of Animals. -M.: Nauka, 2008. – 315ps.
2. Kovalsky V.V. Geochemical Ecology: Essays. -M.: Nauka, 1974.- 299 ps.
3. /Gradova N., Ermakov V., Kovalsky Yu. The use of microbiological synthesis products for correction of microelementhoses // Ecologica. - 2013. - V. 20. - № 72.- P. 575-580.

УДК 579.66

БИОКОНВЕРСИЯ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА В КОРМОВОЙ БЕЛКОВЫЙ ПРОДУКТ

Воробьева Г.И., Заикина А.И., Шолохов Д.С., Акопян В.Б., Бамбура М.В.

Акционерное общество «Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ»
109004, Москва, ул. Александра Солженицына, 27
e-mail: gvorobieva@yandex.ru

При производстве сахара количество отходов в несколько раз превышает количество основного продукта. Примерно 20% свежего свекловичного жома используется на корм скоту, остальные же 80% идет в отвалы, загрязняя окружающую среду продуктами развивающейся в нем, в том числе патогенной микрофлоры.

Ключевые слова: свекловичный жом, кормовой белковый продукт, патогенная микрофлора, гомогенизация, ферментация

Свекловичный жом содержит в основном целлюлозу, пектиновые вещества, сахара и витамины. Однако, в нем весьма мало белка. Институт АО «ГосНИИсинтезбелок» разработал технологию биотрансормации свекловичного жома в высокобелковый кормовой продукт. В рамках этой технологии жом подвергают ультразвуковой обработке, обеспечивая его разволокнение, измельчение и гомогенизацию, после чего проводят ферментацию с использованием консорциумом микроорганизмов – Trichosporon cutaneum ВСЮ-775 и Saccharomyces cerevisiae ВПЧ 12.18, обладающих целлюлазной и пектиназной активностью либо в колбах, в лабораторных условиях, либо в аппаратах с аэрацией в оптимальных условиях биоконверсии с получением кормового продукта с содержанием сырого протеина в пределах (40÷60)% в зависимости от условий ферментации и состава питательной среды.

UDC 579.66

BIOCONVERSION OF BEET PULP INTO THE PROTEIN RICH FODDER

Vorobieva G.I., Zaikina A.I., Sholokhov D.S., Akopyan V.B., Bambura M.V.

Joint-stock company «State Scientific Research Institute of Protein Biosynthesis»
Moscow, 109004, 27, Aleksandr Solzhenitsyn st.
e-mail: gvorobieva@yandex.ru

The amount of waste of sugar production is several times the amount of the basic product.About 20% of fresh beet pulp is used for animal feed, while the remaining 80% goes to waste dumps, polluting the environment.

Keywords: Beet pulp, protein rich fodder, pathogenic microflora, homogenization, fermentation.

The Institute of State Scientific Research Institute of Protein Biosynthesishas developed the technology of biotransformation the beet pulp into the high-protein feed product.Within this technology pulp is subjected to an ultrasonic treatment, providing it grinding and homogenization, and followed by fermentation using the consortium of microorganisms Trichosporon cutaneum ALL-775 and Saccharomyces cerevisiae HPV 12.18 possessing the cellulase and the pectinase activity. Under optimal conditions of bioconversion was obtained feedstuff with crude protein content in the range of (40 ÷ 60)%.

УДК: 550.4: 573.4:577.15:663.15

ГЕОХИМИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Ермаков В.В.[1], Ковальский Ю.В.[2]

[1] ФГБУН Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, 119991, Москва В-334, ул. Косыгина, 19; e-mail: ermakov@geokhi.ru
[2] АО «Государственный НИИ биосинтеза белковых веществ». Москва, Россия 109004, Москва, ул. Александра Солженицына, 27.
e-mail: yukovalsky@mail.ru

Рассмотрены фундаментальные и прикладные вопросы геохимической экологии. Приведены примеры современных инноваций и технологий в области экологического мониторинга, профилактики биогеохимических эндемий и микроэлементозов.

Ключевые слова: геохимическая экология, микроэлементозы, животные, человек, биотехнологии

Геохимическая экология возникла на стыке естественных наук, являясь разделом биогеохимии и общей экологии [2]. Ее роль постоянно возрастает в связи с техногенным преобразованием биосферы и проникновением экологии и биотехнологии во все сферы жизнедеятельности человека [1].

В настоящее время геохимическая экология служит основой инноваций в области экологического мониторинга и диагностики микроэлементозов (использование морфометрических способов индикации, химического элементного состава волосяного покрова и других тканей животных, металотионеинов, металлоэнзимов, ферментной адаптации, технологии профилактики локальных и глобальных биогеохимических эндемий, ремедиации загрязненных почв и отвалов и др.).

Теоретические положения геохимической экологии являются базисом прогнозных оценок эволюции химического состава организмов, а также практических приложений в почвоведении, растениеводстве, микробиологии, животноводстве, медицине и биотехнологии [3].

Литература:
1. Ермаков В.В., Тютиков С.Ф. Геохимическая экология животных. - М.: Наука, 2008. - 315 с.
2. Ковальский В.В. Геохимическая экология: Очерки. - М.: Наука, 1974.- 299 с.
3. Gradova N., Ermakov V., Kovalsky Yu. The use of microbiological synthesis products for correction of microelementhoses // Ecologica. - 2013. - V. 20. - № 72. - P. 575-580.

.....

UDC: 550.4: 573.4:577.15:663.15

GEOCHEMICAL ECOLOGY AND ITS SIGNIFICANCE IN BIOTECHNOLOGICAL RESEARCH

Vadim Ermakov1, Yuri Kovalsky2

1 FSFASci Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of RAS, Kosigin str., 19, V-334 Moscow119991, Russia; e-mail: ermakov@geokhi.ru
2 PC «State Scientific Research Institute of Biosynthesis of Proteins». Alexander Solzhenitsyn, 27, Moscow 109004; e-mail: yukovalsky@mail.ru

The fundamental and applied problems of geochemical ecology are considered. The examples of nowaday innovations and technologies in the field of the environmental monitoring, prevention of biogeochemical endemic and microelementhoses are presented.

Ключевые слова: geochemical ecology, microelementhoses, animals, man, biotechnologies

Geochemical ecology originated at the intersection of the natural sciences as a part of biogeochemistry and general ecology [2]. Its role is constantly increasing due to the anthropogenic transformation of the biosphere and the penetration of ecology and biotechnology in all spheres of human activity [1].

Currently, geochemical ecology is the basis of innovation in the field of the environmental monitoring and diagnosis of microelementhoses (using morphometric methods of indication, chemical elemental composition of hair and other tissues of animals, metallothioneins, metalloenzymes, enzyme adaptation, the prevention technologies of local and global biogeochemical endemic, remediation of contaminated soils and waste dumps, etc.).

Theoretical principles of geochemical ecology is the foundation for predictive assessments of the evolution of the chemical composition of organisms as well as practical applications in soil science, crop production, microbiology, animal husbandry, medicine and biotechnology [3].

Литература:
1. Ermakov V.V., Tyutikov S.F..Geochemical Ecology of Animals. -M.: Nauka, 2008. – 315ps.
2.Kovalsky V.V. Geochemical Ecology: Essays. -M.: Nauka, 1974.- 299 ps.
3. Gradova N., Ermakov V., Kovalsky Yu. The use of microbiological synthesis products for correction of microelementhoses // Ecologica. - 2013. - V. 20. - № 72.- P. 575-580.

.....

СЕКЦИЯ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОБРАЗОВАНИЕ

SECTION

BIOTECHNOLOGY AND EDUCATION

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 378.147

ПОДГОТОВКА МАГИСТРОВ-БИОТЕХНОЛОГОВ В СОВРЕМЕННОЙ СИСТЕМЕ ОБРАЗОВАНИЯ: ПРАКТИЧЕСКИЙ ОПЫТ, ОСОБЕННОСТИ, ПРОБЛЕМЫ, РЕШЕНИЯ

Сироткин А.С.

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, Россия
420015, Казань, ул. Карла Маркса, д. 68
e-mail: asirotkin66@gmail.com

Проанализирован первый опыт массового обучения в магистратуре выпускников бакалавриата. Сделаны выводы об учете комплекса особенностей обучения и необходимости использования разнообразных форм выполнения магистерских диссертаций с учетом множества факторов

Ключевые слова: магистратура, опыт, проблемы и решения, академическая мобильность

С учетом обязательного перехода на систему «бакалавр-магистр» в Российской Федерации, начиная с 2011/12 учебного года, последние два учебных года являются принципиальными с точки зрения получения первого опыта и проведения сравнительного анализа системного обучения по программам магистратуры выпускников бакалавриата и специалитета. Таким образом, стало возможным оценить эффективность обучения в магистратуре выпускников обоих уровней подготовки, потребность в них работодателей, осознать оптимальность магистерских учебных планов обучения и оценить формы магистерских ВКР (диссертаций). Особенности обучения в магистратуре определяются необходимостью подготовки высококвалифицированных кадров, в том числе её использованием в качестве формы переподготовки персонала. Проблемы, связанные с недостатком специальных знаний слушателей в процессе обучения в магистратуре выпускников несмежных, а в отдельных случаях и родственных направлений подготовки и специальностей, попытки сочетать учебу с трудовой деятельностью могут решаться выполнением ВКР в научно-исследовательской, проектно-изыскательской, аналитической, организационно-методической формах. Очевидно, магистратура не должна быть массовой; при этом учебная нагрузка для преподавания в магистратуре должна принципиально отличаться от таковой в бакалавриате в сторону уменьшения. Крайне важным является развитие академической мобильности и обеспечение сетевого взаимодействия университетов по идентичным образовательным программам (например, КНИТУ и РХТУ им. Д.И. Менделеева по программе «Экологическая биотехнология»).

TRAINING OF MASTERS OF BIOTECHNOLOGY IN THE MODERN EDUCATION SYSTEM: PRACTICAL EXPERIENCE, FEATURES, PROBLEMS, SOLUTIONS

Sirotkin A.S.

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia
420015, Kazan, Karl Marx Str. 68
e-mail: asirotkin66@gmail.com

The first mass teaching experience for master education was analyzed. The conclusions about the account of the complex features of education and the necessity to use various forms of implementation for master's theses based on a variety of factors were made

Key words: master-study, experience, problems and solutions, academic mobility

In view of the mandatory transition to a system of «bachelor-master» in the Russian Federation starting with the 2011/12 school year the last two school years are crucial in terms of getting the initial experience and a comparative analysis of training of Masters for Bachelor-graduates and Engineers. Thus, it became possible to assess the effectiveness of the Master training of both degree levels and their need for employers, to realize an optimal curricula for Master training and assess the form of Master's theses. Features of Master degree are determined by the need of training of highly qualified personnel including its use as a form of staff training. The problems associated with a lack of specific knowledge of students in the master degree graduates of non-contiguous education fields and in some cases of related study areas, the attempts to combine study with work can be addressed in the implementation of the theses in research, project (design), survey, analytical, and organizational-methodical forms. Obviously, the Master education should not be mass; at the same time teaching load for training of Masters must be fundamentally different from that of a bachelor degree downward. It is important to develop academic mobility and to ensure the networking of universities that implement identical educational programs such as Master education program «Environmental Biotechnology» in the Kazan National Research Technological University and in the Mendeleev-University.

УДК 378.124.8

ПОДГОТОВКА СПЕЦИАЛИСТОВ НА БАЗЕ КЛАСТЕРА ЛАБОРАТОРИЙ В РАМКАХ ПРОЕКТА «ПРИГЛАШЕННЫЙ УЧЕНЫЙ». ИТОГИ: 2011-2016.

Гарабаджиу А. В., Козлов Г. В.

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия
190013, Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26
e-mail: gar-54@mail.ru

В рамках проекта «Приглашенный ученый» в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте создан кластер лабораторий по разработке новых лекарственных препаратов в составе лабораторий тонкого органического синтеза, молекулярной и клеточной биологии и группы компьютерного моделирования.

Ключевые слова: 220 постановление, проект «приглашенный ученый», подготовка кадров высшей квалификации.

Организованные в 2011 г. лаборатория «Молекулярная фармакология» под руководством профессора Дж. Мелино (Италия, университет Тор Вергата) и в 2013 г. лаборатория «Клеточная биотехнология»(профессор Ш.Мартин, Тринити колледж, Ирландия) , положили начало развитию в СПбГТИ (ТУ) научно-образовательного кластера, объединившего усилия специалистов в области молекулярной биологии, генетики, цитологии, синтетической органической и медицинской химии, компьютерного дизайна биологически активных соединений. Бюджет кластера лабораторий составил ~ 300 млн. рублей, что позволило оснастить лаборатории на уровне лучших молекулярно биологических и химических университетских научных центров Европы.

Организационно кластер лабораторий состоит из тесно взаимодействующих групп тонкого органического синтеза, молекулярной и клеточной биологии и группы компьютерного моделирования. Общей тематической платформой кластера стало регулирование сигнальных каскадов высокого уровня с целью создания на этой основе новых лекарственных препаратов.

Научные исследования кластера проводятся по двум направлениям: первое связано с изучением физиологической функции белков семейства p53 (p63, p73) и механизмов регуляции их стабильности, второе направлено на исследование влияния протеаз, участвующих в гибели клеток и воспалении, на активацию, дезактивацию или протеолиз основных противовоспалительных цитокинов.

Образовательный процесс основан на активном включении бакалавров и магистров в исследовательские работы под руководством аспирантов, научных сотрудников и преподавателей. Наряду с этим проводятся лекции, семинары, круглые столы в виде дискуссионных клубов. Учебный процесс осуществляется в рамках магистерской программы «Молекулярная и клеточная биотехнология» и включает в себя основные курсы:

- «Современные методы генетики человека»
- «От генов к белкам. Регуляция экспрессии генов в бактериях и эукариотах»
- «Основы конструирования лекарств»
- «Низкомолекулярные регуляторы клеточного цикла».

За период работы кластера лабораторий опубликовано более 30 статей в высокорейтинговых международных журналах (IF 5 ÷ 8) проведены 3 международные конференции с участием ученых мирового уровня, подготовлены к защите 2 диссертационных работы по медицинской биотехнологии и 3 работы в области биоорганической и медицинской химии, выпущено 10 бакалавров и 7 магистров.

Оценивая итоги работы кластера лабораторий в 2011 - 2016 г.г., можно с уверенностью говорить о том, что организован современный научно-образовательный центр в области создания лекарственных препаратов на базе объединения лучших разработок медицинской и клеточной биотехнологии, органического синтеза и компьютерного моделирования.

UDC 378.124.8

TRAINING OF SPECIALISTS ON THE BASIS OF A CLUSTER OF LABORATORIES WITHIN THE INVITED SCIENTIST PROJECT. TOTALS: 2011 - 2016.

Garabadzhiu A.V., Kozlov G.V.

State Institute of technology Saint-Petersburg Russia, Saint-Petersburg, Russia
190013, Saint-Petersburg, Moskovsky prospect, 26
e-mail: gar-54@mail.ru

In the framework of the project «Invited scientist» in Saint-Petersburg state Institute of technology created a cluster of laboratories for the development of new drugs in the composition of the laboratories of fine organic synthesis, molecular and cell biology and the group of computer simulation.

Key words: 220 resolution, the project «invited scientist», the training of highly qualified personnel.

Organized in 2011 the laboratory «Molecular pharmacology» under the supervision of professor J. Melino (Italy, University of Tor Vergata) and in 2013 the laboratory «Cellular biotechnology»(proff.S.Martin, Ireland, Trinity college) laid the foundation for development in SSIT (TU) of a scientific and educational cluster, the combined efforts of specialists in the field of molecular biology, genetics, cytology, synthetic organic and medical chemistry, computer design of biologically active compounds. The budget of a cluster of laboratories was ~ 300 million rubles that allowed to equip laboratories at the level of the best biological and chemical university scientific centers of Europe.

Organizationally the cluster of laboratories consists of tightly interacting groups of thin organic synthesis, molecular and cellular biology and group of computer simulation. Regulation of signal stages of the high level for the purpose of new medicines creation on this basis became the general subject platform of a cluster.

Scientific research of a cluster is conducted in two directions: the first is connected to a study of physiological function of proteins of family p53 (p63, p73) and mechanisms of regulation of their stability, the second is directed to a research of influence of the proteases participating in cell death and an inflammation on activation, deactivation or proteolysis of the main anti-inflammatory tsitokins.

Educational process is based on active inclusion of bachelors and masters in research works under the leadership of graduate students, research associates and teachers. Along with it lectures, seminars, round tables in the form of debating clubs are held. Educational process is performed within the master program «Molecular and cellular biotechnology» and includes basic courses:

- «Modern methods of human genetics»
- «From genes to proteins. Regulation of genes expression in bacteria and eukariots»
- «Bases of designing of drugs»
- «Low-molecular regulators of a cellular cycle».

During operation of a cluster of laboratories more than 30 articles in high-rating international magazines (IF 5 ÷ 8) are published, 3 international conferences with an involvement of world-class scientists are held, also 2 dissertations on medical biotechnology and 3 papers in the field of bioorganic and medical chemistry are prepared for defending, 10 bachelors and 7 masters are graduated.

Evaluating totals of operation of a cluster of laboratories in 2011 - 2016, it is possible to say with confidence that the modern scientific and educational center in the field of creation of medicines on the basis of combining of the best development of medical and cellular biotechnology, organic synthesis and computer simulation is organized.

УДК 637.514.92

ПРИМЕРНЫЕ ОСНОВНЫЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОГРАММЫ БАКАЛАВРИАТА И МАГИСТРАТУРЫ ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»

Швец В.И., Биглов Р.Р.

Институт тонких химических технологий Московского технологического университета, Россия, 119454, Москва, пр-т Вернадского, 86.
biglov@mitht.ru

Рассмотрена методология разработки образовательных программ по биотехнологии, приведены варианты профилей (направленности) образовательных программ бакалавриата и магистратуры.

Ключевые слова: биотехнология, образовательные стандарты, примерные основные образовательные программы, профессиональные компетенции, профессиональные стандарты

Примерная основная образовательная программа (ПООП) предназначена для помощи образовательными организациям при разработке ими основной образовательной программы (ООП). С другой стороны, ПООП является нормативным актом, так как устанавливает требования к структуре ООП, перечень профессиональных компетенций (ПК) для базовой части и некоторые другие.

Структура ООП включает обязательную (базовую) часть и часть, формируемую участниками образовательных отношений (вариативную). Перечень компетенций, а также индикаторы (показатели) их достижения, обеспечиваемые дисциплинами (модулями) и практиками обязательной (базовой) части, представленные в ПООП являются обязательными для всех программ в рамках данного направления подготовки.

Образовательная организация самостоятельно осуществляет выбор соответствующих профессиональной деятельности выпускников профессиональных стандартов (при наличии) из реестра профессиональных стандартов (ПС), размещенного в программно-аппаратном комплексе «Профессиональные стандарты» Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации.

При этом из каждого выбранного профессионального стандарта Организация вправе выбрать одну или несколько Обобщенных трудовых функций (ОТФ), полностью или частично, в соответствии с установленным для ОТФ квалификационным уровнем, закрепленными в ОТФ требованиями к образованию и обучению.

На конец 2016 г. Минтрудом утверждено только 5 профессиональных стандартов, в той или иной степени касающихся биотехнологии [1]. ПС для основных профессий биотехнологов пока нет. В этом случае ПК нужно разрабатывать на основе форсайт-анализа требований, предъявляемых к выпускникам данного направления подготовки на рынке труда, анализа рынка труда, обобщения зарубежного опыта, проведения консультаций с ведущими работодателями, объединениями работодателей отрасли, в которой востребованы выпускники основных профессиональных образовательных программ в рамках данного направления подготовки, иных источников. На данном этапе – актуализации существующих ФГОС профессиональным стандартам – можно воспользоваться существующими ПК базовой части ФГОС-3+; при разработке ФГОС-4, необходимо пересмотреть их с учетом методологии проектирования компетенций [2] и более широкого спектра профилей.

Перечень ПК выпускника (для вариативной части) образовательная организация устанавливает самостоятельно, исходя из направленности (профиля) программы (при наличии), с учетом требований ПООП, на основе содержания обобщенных трудовых функций (полностью или частично в зависимости от установленных в профессиональном стандарте требований к образованию и обучению) из соответствующих

профессиональных стандартов (при наличии), выбранных в соответствии с ФГОС, а также, при необходимости, на основе анализа требований к компетенциям, предъявляемых к выпускникам данного направления подготовки на рынке труда, обобщения зарубежного опыта, проведения консультаций с ведущими работодателями, объединениями работодателей отрасли, в которой востребованы выпускники основных профессиональных образовательных программ в рамках данного направления подготовки, иных источников.

Совокупность всех универсальных и общепрофессиональных компетенций выпускника, а также всех профессиональных компетенций выпускника, установленных образовательной организацией для ООП, должна обеспечивать выпускнику способность осуществлять профессиональную деятельность не менее чем в одной области (сфере) профессиональной деятельности, решая при этом не менее одного типа задач профессиональной деятельности, указанных в ФГОС ВО

В ПООП бакалавриата предлагается внести следующие рекомендованные направленности (профили) образовательных программ бакалавриата в рамках направления «Биотехнология», которые соответствуют «цветной» классификации биотехнологий и «Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» [3] Бионанотехнология, Фармацевтическая биотехнология, Медицинская биотехнология, Экологическая биотехнология, Промышленная биотехнология, Биоэнергетика, Сельскохозяйственная биотехнология, Лесная биотехнология, Морская биотехнология. При этом, образовательная организация, проектируя ООП бакалавриата, вправе устанавливать и другие направленности (профили) образовательных программ.

В ООП магистратуры магистерские программы необходимо разрабатывать с учетом направленности (профилей) ООП бакалавриата.

Профессиональные компетенции (ПК) формируются в ПООП для каждой направленности (профиля) образовательной программы и сферы профессиональной деятельности на основе ОТФ ПС. Для каждой направленности (профиля) образовательной программы (вариативная часть) формируется таблица, в которой на основе выделенных задач и объектов ПД (или областей знания) формулируются дополнительные профессиональные компетенции (или расширения профессиональных компетенций).

Нами [4] разработаны два профиля бакалавриата: Бионанотехнология и Фармацевтическая биотехнология, которые, как примеры, можно внести в ПООП.

UDC 637.514.92

APPROXIMATE BASIC EDUCATIONAL PROGRAMS OF UNDERGRADUATE AND GRADUATE IN A DIRECTION «BIOTECHNOLOGY»

Shvets V.I., Biglov R.R.

Institute of Fine Chemical Technology Moscow Technological University, Russia, 119454, Moscow, Prospect Vernadskogo, 86.
biglov@mitht.ru

The methodology of the development of educational programs for biotechnology, given the options of profiles (profile) of educational undergraduate and graduate programs.

Key words: biotechnology, educational standards, exemplary basic educational programs, professional competence, professional standards

Exemplary basic educational program (ПООП) is designed to help educational institutions in the development of basic educational program (ООП). On the other hand, ПООП a normative act, as establishes the requirements for the structure of the ООП, the list of professional competence (ПК) to the base portion, and a few others.

ООП structure includes the mandatory (basic) part and the part formed by the participants of educational relations (variative). The list of competencies, as well as indicators (metrics) to achieve them, provided subjects (modules) and mandatory practices (base) part presented in ПООП are mandatory for all programs in the areas of training given.

The educational organization independently selects the appropriate professional activity of graduates of professional standards (if any) from the register of professional standards (ПС) that is hosted in the software and hardware complex «Professional standards» of the Ministry of Labor and Social Protection of the Russian Federation.

At the same time of each selected professional standard organization may choose one or more than one generic job functions (ОТФ), in whole or in part, in accordance with the laid down in the ОТФ established for the qualification level requirements for education and training.

At the end of 2016 the Ministry of Labor approved only 5 professional standards, to some extent related to biotechnology [1]. ПС for the basic trades biotechnologists yet. In this case, the ПС should be developed on the basis of foresight analysis of the requirements to the graduates of the training areas in the labor market, labor market analysis, generalization of foreign experience, consultation with leading employers, associations of industry employers, which demand graduates of the basic professional educational programs Under this training areas and other sources. At this stage - updating existing ФГОС professional standards - you can use the existing PC base part of the ФГОС-3 +; the development of the ФГОС-4, it is necessary to revise them in the light of design methodology competencies [2] and a wide range of profiles.

List of computer graduates (for the variable part) educational organization sets its own, based on the orientation (Profile) program (if any), taking into account the requirements ПООП, based on the content of generalized labor functions (wholly or partly depending on the established professional standard education requirements and training) of relevant professional standards (if any) selected in accordance with the ФГОС, as well as, if necessary, on the basis of the analysis to the competency requirements for graduates of the training areas in the labor market, generalize foreign experience, consultation with leading employers , industry associations of employers, which demand graduates of the basic professional educational programs in the framework of the areas of training, and other sources.

The set of all-purpose and general professional competencies of graduates, as well as all professional competencies of graduates, established educational organization for the ООП, should provide the graduate's ability to carry out professional activities in at least one area (field) of professional activity, deciding at the same time for at least one type of professional activity tasks specified in the ФГОС.

In ПООП bachelor proposes the following recommended pattern (profiles) educational programs of undergraduate under the direction of «Biotechnology», which correspond to «color» the classification of biotechnology and «Comprehensive program of development of biotechnology in the Russian Federation for the period till 2020» [3] Bionanotechnology, Pharmaceutical Biotechnology , Medical biotechnology, Environmental biotechnology, Industrial biotechnology, Bioenergy, Agricultural biotechnology, forest biotechnology, marine biotechnology. At the same time, educational organization, the ООП engineering undergraduate, and the right to establish other direction (profiles) educational programs.

The ООП Master's Degree program should be developed taking into account the orientation (profiles) ООП Bachelor.

Professional competence (ПК) formed in BNAP for each direction (profile) of the educational program and the scope of professional activities on the basis of the OTF PS. For each direction (profile) of the educational program (Variation of the) table is formed in which additional professional competence (or expansion of professional competences) are formulated on the basis of allocated tasks and ПД objects (or the knowledge).

We [4] developed two undergraduate Profile: Bionanotechnology and Pharmaceutical Biotechnology, which, as examples, may be made in ПООП.

.....

УДК 378.14

СИСТЕМА ПОДГОТОВКИ КАДРОВ В НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЯХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: ovch@ibch.ru

На примере Учебно-научного центра ИБХ РАН представлена система подготовки кадров в научных учреждениях для обеспечения исследований в области биотехнологии. Сформулированы принципы взаимодействия и координации научно-образовательной деятельности научных организаций и высших учебных заведений при обучении студентов и аспирантов в области биотехнологии.

Ключевые слова: подготовка кадров, высшее образование, учебно-научный центр, биотехнология

Динамичное развитие биотехнологии требует принципиально новой системы подготовки кадров. Многолетний опыт Учебно-научного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (далее УНЦ ИБХ РАН) позволяет сформулировать принципы взаимодействия

научных организаций и высших учебных заведений при подготовке кадров в области биотехнологии, обеспечивающие эффективную координацию совместной научно-образовательной деятельности. УНЦ ИБХ РАН совместно с рядом кафедр высших учебных заведений участвует в разработке новых методов и форм образовательной деятельности, подготовке и оптимизации учебных программ, определении перспективных направлений биотехнологического образования.

В УНЦ ИБХ РАН ежегодно обучается около 80 аспирантов и не менее 250 студентов различных вузов, среди которых Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Московский физико-технический институт, Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. Образовательные программы включают не только чтение специальных лекционных курсов, но и проведение больших практикумов, а также выполнение бакалаврских, магистерских и аспирантских научно-исследовательских работ. Учебный план предусматривает значительный объем лабораторных работ на базе УНЦ ИБХ РАН в виде спецпрактикумов по отдельным разделам биотехнологии. Наличие в УНЦ ИБХ РАН лабораторных помещений, оснащенных специальным научным оборудованием, позволяет осуществлять научно-образовательный процесс на современном уровне и обеспечивать опережающий характер высшего биотехнологического образования путём оперативного внедрения в учебный процесс новейших разделов биотехнологии.

УНЦ ИБХ РАН ежегодно проводит зимние молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». В работе школы ежегодно принимает участие более 300 школьников, студентов, аспирантов и молодых специалистов. Совместное проведение научных студенческих школ, молодежных научных конференций, конкурсов молодых исследователей позволяет создать условия для закрепления талантливой молодежи в сфере науки и высшего образования России.

UDC 378.14

SYSTEM FOR TRAINING SKILLED SPECIALISTS IN THE FIELD OF BIOTECHNOLOGY IN RESEARCH INSTITUTIONS

Ovchinnikova T.V.

M.M. Shemyakin & Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10
e-mail: ovch@ibch.ru

Extensive practical experience of the Science-educational centre of M.M. Shemyakin & Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences allows to sum up the principles of interaction between research organizations and higher education institutions for skilled specialists training in the field of biotechnology which ensures strategic coordination of joint scientific and educational activities.

Key words: training system, higher education, science-educational center, biotechnology

Onrush of biotechnology requires a conceptually new system of personnel training. Extensive practical experience of the Science-educational centre of M.M. Shemyakin & Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences (hereinafter SEC IBCh RAS) allows to sum up the principles of interaction between research organizations and higher education institutions for skilled specialists training in the field of biotechnology which ensures strategic coordination of joint scientific and educational activities. SEC IBCh RAS in cooperations with higher education institutions is involved in the implementation of novel forms of educational activities, optimization of training programs, development of most promising aspects of biotechnology education.

Annually SEC IBCh RAS trains about 80 postgraduate students and 250 graduate students from various universities, including M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow Institute of Physics and Technology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology. Educational programs include lecture and laboratory courses as well as the pursuance of bachelor, master and post-graduate research work. Training curriculum provides a substantial portion of experimental work at SEC IBch RAS in different fields of biotechnology. The SEC laboratory facilities and special scientific equipment allow to conduct educational process at a state-of-art level.

Every year the SEC IBCh RAS run winter school «Current trends in physicochemical biology and biotechnology»

for young scientists. The schools are attended by more than 300 secondary school, graduate and postgraduate students, as well as by young specialists. Such conferences and competitions of young scientists involve talented young scientist in modern research and development of innovations in the field of biotechnology.

УДК 378

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РАБОТОДАТЕЛЯМИ ПРИ ПОДГОТОВКЕ БАКАЛАВРОВ В ОБЛАСТИ РАЗРАБОТКИ И ВНЕДРЕНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ПРОДУКТОВ ЗДОРОВОГО ПИТАНИЯ

Иванова В.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского (ПКУ)», Москва, Россия
109004, г. Москва, ул. Земляной Вал, д.73
e-mail: rektorat@mgutm.ru

Современные требования к кадрам пищевой и перерабатывающей промышленности требуют формирования новой модели учебного процесса, включающей развитие партнерских отношений с работодателями и использование инновационных технологий обучения. В ФГБОУ ВО «МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ)» имеется наработанный опыт реализации такой модели при подготовке технологов, в том числе в области инновационных продуктов здорового питания.

Ключевые слова: работодатель; технология пищевых производств; образование; опыт; внедрение; проектное обучение; комплексные выпускные квалификационные работы.

В соответствии с Указом Президента Российской Федерации « Об утверждении приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации», Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации, Стратегии развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации до 2020 года, Основ государственной политики в области здорового питания населения на период до 2020 года пищевая и перерабатывающая промышленность России стала системообразующей сферой народного хозяйства, формирующей агропродовольственный рынок, продовольственную и экономическую безопасность страны.

Совершенно очевидно, что решение поставленных Президентом и Правительством России задач требует новых, современных, инновационных технологий подготовки кадров. В этих условиях прежние модели образования не удовлетворяют запросам государства и общества.

ФГБОУ ВО «МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ)» в своей Стратегии развития до 2020 года в качестве приоритетного направления выбрал формирование вуза предпринимательского типа. В университете выстроена система сетевого взаимодействия с работодателями, ведущими отраслевыми научно-исследовательскими институтами пищевой промышленности через создание базовых кафедр на площадках НИИ, внедрением новых технологий обучения студентов. В частности, в университете внедрены технологии проектного обучения, которые сопровождают учебный процесс от первого до последнего курса. В результате на выпускном курсе при выполнении выпускной квалификационной работы студенты разных специальностей (технологи, экономисты, маркетологи и др.) объединены в проектные группы по выполнению комплексных выпускных квалификационных работ-проектов. Научное руководство комплексных ВКР обеспечивается преподавателями вуза, работодателями, учеными НИИ, среди которых подавляющее большинство являются академиками и членами-корреспондентами РАН.

Это позволяет бакалаврам разрабатывать, внедрять и защищать патентами инновационные продукты нового поколения, в том числе восполняющих дефицит полноценного белка и микронутриентов, улучшающих питание детей и подростков, обеспечивающих качество и безопасность отечественных продуктов, проводить политику государства в вопросах здорового питания.

ABOUT INTERACTION WITH EMPLOYERS WHEN TRAINING BACHELORS IN THE FIELD OF DEVELOPMENT AND DEPLOYMENT OF INNOVATIVE PRODUCTS OF HEALTHY FOOD

Ivanova V. N.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of technologies and management named after K.G. Razumovsky (The First Cossack University)
109004, Moscow, 73, Zemlyanoy Val
e-mail: rektorat@mgutm.ru

Modern requirements to personnel of food and processing industry demand formation of a new model of the educational process, including development of partnership with employers and the use of innovative technologies of training. In Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of technologies and management named after K.G. Razumovsky (The First Cossack University) there is an acquired experience of realization of such a model when training technologists, including training in the field of innovative products of healthy food.

Key words: employer; technology of food productions; education; experience; introduction; project-based learning; complex final qualification graduation works.

According to the Decree of the President of the Russian Federation «About the statement of the priority directions of development of science, technologies and engineering in the Russian Federation», Food Security Doctrine of the Russian Federation, the Strategy of development of food and processing industry of the Russian Federation until 2020, Basics of the state policy in the field of healthy nutrition for the period until 2020, food and processing industry of Russia has become the backbone sphere of the national economy forming the market of agricultural produce, food and economic security of the country.

It is obvious that the solving of tasks set by the President and the Government of Russia demands new, modern, innovative technologies of training. In these circumstances, the old model of education does not meet the needs of the state and society.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of technologies and management named after K.G. Razumovsky (The First Cossack University) chose as the priority direction the formation of higher education institution of entrepreneurial type in the Development strategy of the university till 2020. The system of network interaction with employers, the leading branch research institutes of the food industry through creation of basic departments on scientific research institute platforms, introduction of new technologies of training of students is built at university.

In particular, the university introduced the technology of project-based learning that accompany the process of education from the first to the last course. As a result, students of different specialties (engineers, economists, marketers, and others) working at the final qualifying work in the final year of education, are combined in project teams to implement comprehensive final qualifying work projects. Scientific management of complex graduation and qualification work is provided by university teachers, employers, academics, scientists from research institutes, among which the vast majority are academicians and corresponding members of the Russian Academy of Sciences.

It allows bachelors to develop, implement and protect the patents of innovative products of a new generation, including supplement the deficit of valuable protein and micronutrients that improve the nutrition of children and adolescents, ensuring the quality and safety of domestic products, to carry out government policy in matters of healthy diet.

.....

УДК: 378.147.34

ОРГАНИЗАЦИЯ СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ И ТЕКУЩЕГО КОНТРОЛЯ ПРИ ИЗУЧЕНИИ КУРСА «МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ» ДЛЯ МАГИСТРАНТОВ.

Красноштанова А.А.

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
г. Москва, Российская Федерации
125047, г. Москва, Миусская пл., д.9, РХТУ имени Д.И.Менделеева
e-mail: aak28@yandex.ru

Проведён анализ результатов рейтингового контроля знаний магистрантов 1-го курса, обучающихся по направлению 19.04.01 «Биотехнология» при изучении курса «Методологические основы исследований в биотехнологии». Показана важность использования активных форм обучения.

Ключевые слова: магистратура, биотехнология, активные формы обучения, рейтинговый контроль знаний.

Обучение магистрантов по направлению 19.04.01 «Биотехнология» предполагает изучение курса «Методологические основы исследований в биотехнологии». Рейтинговый контроль знаний по дисциплине включает: характеристику объекта и предмета исследований, патентный поиск по теме диссертации, характеристику системы подготовки биотехнологов в ведущих университетах мира. Характеристику предмета и объекта исследований студенты дают в форме кратких устных сообщений. Вопросы докладчику задают сами обучающиеся. Рейтинговая оценка складывается из качества доклада и ответов на вопросы, а также количества вопросов, заданных сокурсникам. Среди студентов выделяются наиболее активно участвующие в обсуждении (15%), средней активности (20%), низкой активности (34%), не принявшие участия в обсуждении (31%). Важнейшим критерием оценки рейтинговых заданий по проведению патентного поиска и характеристики биотехнологического образования за рубежом является наличие собственного анализа информации, найденной в поисковых системах. Анализ студенческих работ показывает, что он выполнен только 65% студентов, тогда как остальные ограничиваются лишь простым пересказом собранной информации.

Таким образом, используемые формы рейтингового контроля знаний и система их оценивания при изучении курса «Методологические основы исследований в биотехнологии», способствуют формированию у магистрантов способности к самостоятельному обучению новым методам исследования, к изменению научного и научно-производственного профиля своей профессиональной деятельности.

.....

UDC: 378.147.34

THE ORGANIZATION OF SEMINAR OCCUPATIONS AND MONITORING WHEN STUDYING A COURSE

Krasnoshtanova A. A.

«Methodological bases of researches in biotechnology» for masters.
Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia,
Moscow, Russian Federation, 125047, Moscow, Miusskaya Square, 9.
e-mail: aak28@yandex.ru

The analysis results of rating monitoring for first-year masters knowledge studying in the direction 19.04.01 «Biotechnology» when studying the course «Methodological Bases of Researches in Biotechnology» was carried out. Importance of use of the fissile forms of education was shown.

Key words: masters, biotechnology, the active forms of education, rating monitoring of knowledge.

Tutoring of masters in the direction 19.04.01 «Biotechnology» assumes studying of the course «Methodological Bases of Researches in Biotechnology». Rating monitoring of knowledge on this subject includes: the characteristic of an object and subject of researches, patent search in a thesis, the characteristic of system of tutoring biotechnologists at leading universities of the world. Students give the characteristic of a subject and object of researches in the form of short oral messages. Questions to the speaker are asked by students. Rating assessment consists of quality of the report and answers to questions, and also quantities of the questions asked fellow students. The students who are most actively participating in discussion, (15%), the ones having average activity (20%), low activity (34%) and the ones which did not take part in discussion (31%) were distinguished from masters. The most important criterion for evaluation of rating tasks on carrying out patent searching and the characteristic of biotechnological education abroad is presence of characteristic analysis of information. The

analysis of student's works showed that it was carried out by only 65% of students whereas the others were limited only to prime retelling of collected information. Thus, the used forms of rating monitoring of knowledge and system of their estimation when studying the course «Methodological Bases of Researches in Biotechnology», promote formation at students of ability to self-contained training in new research techniques, to change of a scientific and research and production profile of the professional activity.

УДК 378.4

ПРОВЕДЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКИ У СТУДЕНТОВ НАПРАВЛЕНИЯ ПОДГОТОВКИ 19.03.01 И 19.03.04 БИОТЕХНОЛОГИЯ: ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Корнеева О.С., Шуваева Г.П., Свиридова Т.В., Гойкалова О.Ю.

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
394036, Россия, г. Воронеж, проспект Революции, д. 19
e-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

Показана роль производственной практики в профессиональной ориентации бакалавров и магистров направлений подготовки 19.03.01 и 19.03.04.

Ключевые слова: профессиональная ориентация, бакалавриат, магистратура, профессиональные компетенции

Знания, умения и навыки, приобретённые студентом в вузе, даже при высокой их оценке, не дают ему возможности быстро и продуктивно включиться в процесс производства. Для относительно быстрой адаптации бакалавра и магистра к трудовой деятельности необходима предварительная его подготовка (профессиональная ориентация), заключающаяся: во-первых, в знании технологического процесса производства всего ассортимента продуктов; во-вторых, знание методов контроля на каждом этапе производства; в-третьих, знание Федеральных законов относительно качества этих продуктов.

Выпускник должен реально представлять связь между качеством сырья, этапами его переработки, расфасовкой и упаковкой, условиями хранения, с одной стороны, и показателями (физико-химическими, сенсорными, микробиологическими и пр.) готового продукта, с другой, чтобы, находясь на том или ином участке производства, грамотно и эффективно использовать приобретённые знания, совершенствовать их. Такая перспектива возможна только при целевой подготовке специалиста с первых шагов его обучения - целенаправленного, регламентированного планами и программами, управляемого процесса усвоения знаний, умений и навыков. Особое значение в обучении имеют те формы учебно-познавательной деятельности вуза, в которых студент формируется как субъект производственной деятельности: проведение опытов в лабораторных условиях предприятий, учебные исследования в условиях производства, к которым относятся курсовые работы, рефераты, выполнение творческих учебных заданий в соответствии с задачами производства. Естественно, что в этом случае определяющую роль играет производственная практика.

Целью производственной практики студентов - биотехнологов является формирование профессиональных компетенций, связанных с получением первичных трудовых навыков на рабочем месте того или иного предприятия, приобретении общих представлений о работе предприятия, организации производственных процессов, конструкционных особенностях и эксплуатационных характеристиках основных единиц технологического оборудования для выпуска продукции в соответствии с профилем биотехнологии.

За время прохождения производственной практики студенты должны подготовить себя к решению ряда задач в области научно-исследовательской и производственно-технологической деятельности, что, несомненно, накладывает особую ответственность как на руководителя практикой от вуза, так и на представителей предприятия. Основная проблема состоит в том, что в Воронеже и Воронежской области нет достаточного количества предприятий, на которых студенты могли бы в полной мере ознакомиться с производством всего ассортимента продуктов, соответствующих различным направлениям биотехнологии. Сотрудниками кафедры биохимии и биотехнологии ВГУИТ был проведён мониторинг предприятий биотехнологического профиля, и руководство университета выступило с инициативой о прохождении на их базе производственной практики. Между вузом и руководством предприятий были заключены официальные соглашения.

Надо отметить, что на предложение сотрудничать в сфере подготовки бакалавров-биотехнологов откликнулись различные представители г.г. Пензы, Москвы, Курска, Санкт-Петербурга но возникла проблема проживания студентов, так как не все предприятия могут предоставить общежитие или съёмную квартиру. В перспективе необходимо работать над получением различного рода заявок, договоров с предприятиями, грантов и пр., что позволит студенту объединить свои творческие успехи в области науки и работу в интересах производства. У качественного специалиста должны быть сформированы профессиональные компетенции, связанные с получением общих представлений о работе широкого спектра предприятий, выпускающих разнообразные продукты биотехнологии, которые основываются на прочной теоретической базе знаний, полученных в процессе обучения и научно-исследовательской деятельности.

Ответственным за проведение производственной практики необходимо проводить работу в таком направлении, чтобы каждый студент, выполняя конкретные задачи на производстве, помимо освоения теоретической базы, смог бы провести обширную серию экспериментов для своих будущих выпускных квалификационных работ, приобрести одновременно общие практические умения и навыки, и углубив свою теоретическую подготовку.

UDC 378.4

LEADING PRODUCTION PRACTICE FOR STUDENTS IN EDUCATION FIELDS 19.03.01 AND 19.03.04 BIOTECHNOLOGY: PROBLEMS AND THEIR SOLUTIONS

Korneeva O.S., Shuvaeva G.P., Sviridova T.V., Goykalova O.Yu.

Voronezh state university of engineering technologies
394036, Russia, Voronezh, Revolutsii av., 19
e-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

Shown the role of work experience in the professional orientation of bachelors and masters training areas 19.03.01 and 19.03.04.

Key words: professional orientation, undergraduate, graduate, professional competence

The knowledge and skills, acquired by a student in high school, even if they are estimated high, still do not give him or her any opportunity to quickly and efficiently get involved into the production process. For a relatively quick adaptation of a Bachelor or a Master to work processes, it requires pre-training (professional orientation), consisting of: first, the knowledge of the manufacturing process of the entire range of products; second, the knowledge of controlling methods at every stage of manufacturing; third, the knowledge of federal laws regarding the quality of these products. The graduate should really understand the connection between the quality of the raw material, the stages of its processing, prepackaging and packing, storage conditions, on the one hand, and the markers of a finished product (physicochemical, sensory, microbiological etc.), on the other hand, to be able to use the acquired knowledge correctly and effectively as well as to improve it, working on any production sector. Such a prospect is only possible with the aimed training of specialists from the very first steps of their studies – a focused, controlled process of knowledge and skills acquisition, regulated by plans and programs. Of particular importance in the training are the forms of educational and informative activities of the high school in which the student is formed as a subject of production activity: conducting experiments in laboratory conditions of companies, educational research in production conditions which include term papers, essays, performing creative learning activities in accordance with the production tasks. Naturally, in this case, production practice plays a decisive role. The purpose of the production practice of biotechnology students is the formation of professional competence related to obtaining basic working skills on the workplace of a company, the acquisition of a common understanding of the enterprise working processes, the organization of production processes, structural features and operating characteristics of the basic units of technological equipment for manufacturing products in accordance to the field of biotechnology. During the production practice, students have to prepare themselves to solve a number of problems in the field of scientific research as well as of industrial and technological activities which certainly imposes a special responsibility both upon the head of practice at the university and upon the representatives of the company. The main problem is that Voronezh and the Voronezh region do not have enough companies, in which students could be fully acquainted to the production of the whole range of products corresponding to the different areas of biotechnology. The employees of the Department of Biochemistry and Biotechnology of VSUIT have conducted a monitoring of

biotechnological companies, and the university authorities took the initiative of leading production practice on their basis. Formal agreements have been signed between the university and the managing representatives of the companies. It should be noted that the proposal to cooperate in the field of training Bachelors of Biotechnology was responded by various representatives from the cities like Penza, Moscow, Kursk and St. Petersburg; but there has appeared the problem of the residence for students, as not all companies can provide a hostel or an apartment for rent. In the future, it is necessary to work on receiving various kinds of applications, contracts with companies, grants, etc. which would allow students to combine their creative achievements in science with work for a manufacturing company. A high-level specialist should possess professional competence associated with obtaining a common understanding of the work of a wide range of companies, producing various biotechnological products, which are based on a solid theoretical knowledge basis gained in the process of studying and in research activities. The ones responsible for leading production training need to carry out their work in such a way so that each student, performing specific tasks in the workplace, in addition to the development of a theoretical framework, would be able to perform an extensive series of experiments for his or her future final qualifying thesis, and at the same time to purchase general practical skills and to deepen his or her theoretical knowledge base.

УДК 663.1

О РАЗРАБОТКЕ ФГОС 3++ ПО ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫМ ПРОГРАММАМ ФЕДЕРАЛЬНОГО УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОГО ОБЪЕДИНЕНИЯ 19.00.00 В ОБЛАСТИ ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Мезенова О.Я., Титова И.М., Чернова А.В.

ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия, 236022, Калининград, Советский проспект, 1
e-mail: mezenova@klgtu.ru

Рассмотрены проекты Федеральных государственных образовательных стандартов (ФГОС) третьего поколения (3++) по направлениям подготовки бакалавриата и магистратуры в области пищевых технологий и биотехнологии

Ключевые слова: ФУМО, ФГОС, образовательные программы

В 2016 образовано ФУМО «Промышленная экология и биотехнологии», одной из основных задач которого является разработка ФГОС нового поколения. Отделение пищевых технологий и биотехнологии данного ФУМО разработало 9 проектов ФГОС 3++ по направлениям: 19.03.01 и 19.04.01 «Биотехнология», 19.03.02 и 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья», 19.03.03 и 19.04.03 «Продукты питания животного происхождения», 19.03.04 и 19.04.04 «Технология продукции и организация общественного питания», 19.04.05 «Высокотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения». Данные ФГОС относятся к третьему поколению образовательных стандартов, их отличием является ориентация на профессиональные стандарты, определяющие взаимодействие рынка труда и системы образования. В ФГОС прописаны области профессиональной деятельности, входящие в Реестр профессиональных стандартов, в которых выпускники могут осуществлять профессиональную деятельность. Основные области: 01- Образование, 02 – Здравоохранение, 13 - Сельское хозяйство, 15 -Рыбоводство и рыболовство, 22 - Пищевая промышленность, 26 - Химическое, химико-технологическое производство, 33 – Сервис, общественное питание; 40 - Сквозные виды профессиональной деятельности в промышленности. Выпускники могут работать и в других областях при условии соответствия уровня образования и полученных компетенций требованиям к квалификации работника.

UDK 663.1

ON THE DEVELOPMENT OF FGOS 3++ ON EDUCATIONAL PROGRAMS FEDERAL TEACHING UNION 19.00.00 IN THE FIELD OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Mezenova O.J.

Kaliningrad State Technical University», Kaliningrad, Russia,
236022, Kaliningrad, Soviet Avenue 1
e-mail: mezenova@klgtu.ru

The draft of the Federal State Educational Standards (FSEP), the third generation (3 ++) in areas of training undergraduate and graduate programs in the field of Food Technology and Biotechnology have been considered

Key words: FUMO, FSEP, educational programs

In 2016 FUMO «Industrial ecology and biotechnology «was it formed, one of the main tasks of which is to develop a new generation of FSEP. Department of Food Technology and Biotechnology of the FUMO has developed 9 FSEP projects 3 ++ in directions: 19.03.01 and 19.04.01 «Biotechnology», 19.03.02 and 19.04.02 «Food from plants», 19.03.03 and 19.04.03 «Products of animal origin», 19.03.04 and 19.04.04 «Technology of production and catering «19.04.05» The high-tech production of functional and special purpose foods «. These refer FSEP to the third generation of educational standards, their difference being the focus on professional standards which determine the interaction of the labor market and the education system. The FSEP prescribed area of professional activity included in the register of professional standards in which graduates can carry out professional activities. Main areas: 01- Education, 02 - Health 13 - Agriculture, Fisheries and -Rybovodstvo 15, 22 - Food industry 26 - chemical, chemical-technological production, 33 - service, catering; 40 - Through professional activities in the industry Graduates can work in other areas, provided the level of education and competency requirements for the qualification of the worker is met.

.....

УДК 378

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В МНОГОУРОВНЕВОМ И НЕПРЕРЫВНОМ ОБРАЗОВАНИИ ПО ТЕХНОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА БАЗЕ МГУПП

Титов Е.И., Тихомирова Н.А.

Московский государственный университет пищевых производств (ФГБОУ ВО МГУПП), г. Москва, Россия
125480, Москва, Волоколамское ш.11.
e-mail: kafedra.tmmp @ yandex.ru

Подготовка специалистов высшего образования «Продукты питания животного происхождения» осуществляется более 80 лет по профилям: технология мяса и мясных продуктов, технология рыбы и рыбных продуктов, технология молока и молочных продуктов, пищевая биотехнология, пищевая микробиология. Обучение в МГУПП по многоуровневой системе проходят студенты из 20 стран.

Ключевые слова: направление подготовки «Продукты питания животного происхождения», многоуровневое образование.

Направление подготовки высшего образования «Продукты питания животного происхождения» в РФ имеет глубокие корни. В 1930г. был создан Московской химико-технологический институт мясной промышленности (в настоящее время ФГБОУ ВО МГУПП) на технологическом факультете, которого начали подготовку специалистов мясной промышленности. С 1945г. при технологическом факультете создано отделение подготовки инженеров-технологов молочной промышленности. В 1995г. создается УМО по образованию в области технологии сырья и продуктов животного происхождения, а в 2000г. приказом Минобразования России (№3206 от 08.11.2000г.) к его компетенции отнесены следующие направления и специальности высшего профессионального образования: Технология сырья и продуктов животного происхождения, включающая технологию мяса и мясных продуктов, технологию рыбы и рыбных продуктов, технологию молока и молочных продуктов, пищевую биотехнологию; технологию и дизайн упаковочного производства; технологическая эксплуатация и обслуживание транспортных и технологических машин и оборудования (холодильные установки, оборудование и системы кондиционирования). За 86-летний период было подготовлено около 30 тысяч высококвалифицированных специалистов, которые успешно трудятся на предприятиях мясной, рыбной, молочной промышленности; на государственной службе; в НИИ Российской академии наук, в научных отраслевых центрах Российских и зарубежных фирм, а также в

индустрии детского, функционального и спортивного питания. В числе выпускников – зарубежные граждане из Алжира, Боливии, Венгрии, Вьетнама, Египта, Камеруна, Китая, Кубы, Иордании, Мали, Монголии, Непала, Сирии, Туниса и ряда других стран дальнего и ближнего зарубежья. С начала 2000-х гг. начато обучение по многоуровневой системе образования. С 2006г. осуществляется подготовка по магистерским программам: «Биотехнология продуктов животного происхождения»; «Пищевая микробиология». Подготовлены новые магистерские программы: «Современные технологии модификации свойств сырья с использованием пищевых добавок, ингредиентов и функционально активных веществ при производстве мясных продуктов»; «Инновационные технологии биотрансформации сырья животного происхождения физическими методами воздействия»; «Современные технологии диетических и профилактических продуктов питания на мясной основе для различных профессионально-возрастных групп населения»; «Инновационные технологии производства мясных и мясосодержащих продуктов с учетом термического состояния сырья»; «Современные технологии глубокой переработки птицы и кроликов»; «Технологии продуктов животного происхождения с использованием функциональных стартовых культур»; «Современные технологии мороженого и замороженных десертов». Теоретическая и практическая работа проводится в лабораториях научно-исследовательских институтов Академии наук РФ и ведущих предприятиях промышленности. Заключены договора по академической мобильности с Алматинским технологическим университетом, Монгольским Государственным Университетом Науки и Технологии. Интеграция науки, производства, образования на основе базовых кафедр, Университетского комплекса, включающего НИИ, предприятия, с привлечением IT технологий и современных образовательных программ позволяет готовить выпускников на уровне мировых стандартов и современного рынка труда.

FUTURE DIRECTIONS IN MULTILEVEL AND CONTINUOUS EDUCATION IN TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY PRODUCTS FROM ANIMAL RAW MATERIALS ORIGIN OF ON THE BASIS OF THE MGUPP

Titov E.I., Tikhomirova N.A.

Moscow State University of Food Production (FGBOU VO MGUPP), Moscow, Russia.
125480, Moscow, Volokolamskoe st.11.
e-mail: kafedra.tmmp @ yandex.ru

Training of specialists of higher education « Products from animal raw materials origin « is more than 80 years, profile: technology of meat and meat products, technology of fish and fish products, technology of milk and dairy products, food biotechnology, food microbiology. Training in MGUPP on a tiered system of pass students from 20 countries.

Key words: direction of preparation «Products from animal raw materials origin», multi-level education.

The direction of training of higher education « Products from animal raw materials origin « has deep roots in Russia. The Moscow chemical-technological Institute of meat industry (currently of the MGUPP), Department of technology, which started training of specialists of meat industry, was created in 1930. Department of engineers of the dairy industry of technology faculty training was founded since 1945. The Association for education in technology of raw materials and products of animal origin was created in 1995, but the following directions and specialties of higher professional education: Technology of raw materials and products of animal origin, including technology of meat and meat products, technology of fish and fish products, milk and dairy products technology, food biotechnology; technology and design of packaging production; operation and maintenance of transport and technological machines and equipment (refrigerating installation, equipment and conditioning systems) was competed by order of the Ministry of education of Russia (№3206 from 08.11.2000 g) in 2000. About 30 thousand highly qualified specialists who successfully work at enterprises of meat, fish, dairy industry; public service; research Institute of the Russian Academy of Sciences, sectoral research centers of Russian and foreign companies, as well as in the children's industry, functional and sports nutrition have been prepared during 86-years period. In the number of graduates, there are foreign nationals from Algeria, Bolivia, Hungary, Vietnam, Egypt, Cameroon, China, Cuba, Jordan, Mali, Mongolia, Nepal, Syria, Tunisia and other countries near and far abroad. Training on multi-level system of education began since the early 2000s. master's programs: «Biotechnology of products of animal origin»; «Food Microbiology». Preparation for new master's programs: «Modern technologies of modification of properties of raw materials, using food additives, ingredients and functionally active substances in the manufacture

of meat products»; «Innovative technologies of biotransformation of raw materials of animal origin by physical methods of influence»; «Modern technologies and preventive dietary foods based on meat for different vocational and age groups»; «Innovative technologies of production of meat and meat-containing products, based on thermal condition of raw materials»; «Modern technologies of deep processing of poultry and rabbits»; «Technology of products of animal origin with the use of functional starter cultures»; «Modern technologies of ice cream and frozen desserts» has been carried out since 2006. Theoretical and practical work is carried out in the laboratories of scientific research institutes of the Academy of Sciences and leading industrial enterprises. Contracts for academic mobility of Almaty technological University, Mongolian State University of Science and Technology were concluded. Integration of science, industry, education based on departments of the University complex, which includes Science Research Institutes , companies with the involvement of IT technologies and modern educational programs allow to prepare competent specialists on the level of world standards.

УДК 378+60+577.21

РОЛЬ БАЗОВОЙ КАФЕДРЫ ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИИ СПХФА В СТРАТЕГИИ ОТЕЧЕСТВЕННОГО И МЕЖДУНАРОДНОГО ТРАНСФЕРА ЗНАНИЙ В ОБЛАСТИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Басакина И.И., Наркевич И.А., Трухин В.П., Красильников И.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А
e-mail: i.basakina@mail.ru

Приведены перспективы деятельности базовой кафедры иммунобиотехнологии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии. Показано, что реализация проекта позволит обеспечить соответствие образования потребностям общества в сфере современной биотехнологической промышленности.

Ключевые слова: базовая кафедра, иммунобиотехнология.

Биофармацевтическая промышленность является одной из наиболее прибыльных и быстроразвивающихся отраслей, как в Российской Федерации, так и во всем мире, что требует уникального теоретического образования и концентрации специфических технических навыков для будущих специалистов.

С целью подготовки обучающихся по актуальным направлениям научной и практической деятельности биотехнологического профиля в ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России создана кафедра иммунобиотехнологии, осуществляющая свою деятельность на базе ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» ФМБА России [1].

Следует отметить, что формирование и обеспечение деятельности базовой кафедры не только совершенствует учебный процесс СПХФА за счет включения ведущих высококвалифицированных сотрудников предприятия в цикл лекционных и практических занятий, мастер-классов, руководство магистерскими работами, практиками и стажировками, а также привлечения студентов к выполнению исследований, но и позволяет предприятию получить специалиста с компетенциями востребованными в современных условиях. Кроме того, кафедру можно рассматривать как платформу, где обучающийся может реализовать свои идеи, а предприятие может подобрать студента для своих проектов.

В настоящее время один из векторов деятельности ВОЗ смещен в сторону вопросов иммунизации, вакцин и биотехнологических препаратов, что отражено в соответствующих программах и проектах. В период Десятилетия вакцин, заявленного на Шестьдесят пятой сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения, утвержден Глобальный план действий в отношении вакцин на 2011–2020 гг. в рамках которого рассматривается ряд проблемных вопросов связанных с препятствиями на пути к стабильному использованию иммунобиологических препаратов во многих развивающихся странах, что обусловлено высокими ценами и несовершенством систем здравоохранения. С целью решения данной проблемы требуется всестороннее привлечение различных заинтересованных сторон для участия в поисках, разработке и

доставке иммунобиологических препаратов. Для того чтобы расширить производственную базу и содействовать необходимому производству вакцин по доступным ценам, были определены два информационно-справочных центра: в Нидерландском институте вакцин – для поддержки передачи технологии, и в университете Лозанны, Швейцария – для обеспечения доступа к ноу-хау по адъювантам и рецептурам [2].

Учитывая вышеизложенное, обращает внимание тот факт, что кафедра иммунобиотехнологии в рамках сотрудничества с совместным российско-никарагуанским предприятием по производству вакцин Mechnicov S.A. выступает научно-учебный центром в области внедрения передового опыта среди профильных студентов, ученых и специалистов, а также поддержки укрепления ресурсов развивающихся стран в отношении биотехнологической информации, услуг, исследований, обучения для содействия прогресса здравоохранения.

Таким образом, можно сделать вывод, что реализация проекта создания базовой кафедры позволит обеспечить соответствие образования потребностям общества в сфере современной иммунобиотехнологии.

THE ROLE OF SPECIALIZED DEPARTMENT OF IMMUNOBIOTECHNOLOGY OF SPCPA IN THE STRATEGY OF DOMESTIC AND INTERNATIONAL TRANSFER OF KNOWLEDGE IN THE BIOPHARMACEUTICAL INDUSTRY

Basakina I.I., Narkevich I.A., Trukhin V.P., Krasilnikov I.V.

FSBEI HE «Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy» of the Russian Ministry of Healthcare, Saint-Petersburg, Russia
197376, Saint-Petersburg, Professor Popov str., lit. A, 14
e-mail: i.basakina@mail.ru

The essay has demonstrated the prospects of activity of Specialized Department of Immunobiotechnology of Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy. It has proved that implementation of the project will provide for acceptability of education to the needs of the society in the field of modern biotechnology industry.

Key words: Specialized Department, Immunobiotechnology.

Biopharmaceutical industry is one of the most profitable and fastest growing industries both in the Russian Federation and all over the world, which requires future professionals to possess the unique theoretical education and concentration of the specific technical skills.

In order to educate students in the actual aspects of scientific and practical activity in biotechnological field, the Department of Immunobiotechnology, which operates on the basis of FSUE «Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccine and Sera and Bacterial Preparations Production Enterprise» for FMBA of Russia, has been established on the base of FSBEI HE Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Russian Ministry of Healthcare [1].

It should be noted that the establishment and maintenance of activity of the Specialized Department not only enhances the teaching process in SPCPA, thanks to involvement of the company's leading highly qualified staff in the cycle of lectures and workshops, master-classes, supervision of masters' works, practical and probation training, as well as attracting students to implementation of the researches, but also provides enterprises with professionals possessing the competencies that are so highly demanded in the modern world. Moreover, the Department may be considered as a platform where a student may embody their ideas, and the company is at choice to involve students in their projects.

Currently, one of the vectors in the activities of WHO has shifted towards the issues of immunization, vaccines and biotechnological preparations, and this trend is reflected in the relevant programs and projects. During the Decade of Vaccines, which has been declared at the sixty-fifth session of the World Health Assembly, the Global Plan of Action for Vaccines for years 2011-2020 has been approved, within the framework of which a number of problematic issues related to the obstacles preventing sustainable use of immunobiological drugs in many developing nations, due to high prices and imperfection of healthcare systems, have been considered. Solving this problem requires comprehensive involvement of various stakeholders to participate in the search, development and delivery of the immunobiological drugs. In order to expand the production base and to promote production of the necessary vaccines at affordable prices, the two information service centers have been identified in the Netherlands Vaccine Institute – to support technology transfer, and in the University of Lausanne, Switzerland – to provide access to the relevant know-how on adjuvants and formulations. [2]

Against this background, it is worth noting that the Department of Immunobiotechnology, in cooperation with

Mechnicov S.A., Russian Nicaraguan joint venture dealing with vaccine production, acts as scientific and educational center in the field of implementation of the best practices among students, scientists and experts in this field, as well as support for enhancing there sources of the developing countries with respect to biotechnology information, services, researches and education to promote healthcare progress.

Thus, we may ultimately draw a conclusion that implementation of the project of creation of the Specialized Department will provide for acceptability of education to the needs of the society in the field of modern biotechnology industry.

УДК 378.1+504.6

РОЛЬ НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА «ЭКОБИОТЕХНОЛОГИЯ» В ПОВЫШЕНИИ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Алферов В.А.[1], Понаморева О.Н.[1], Решетилова Т.А.[2], Боронин А.М.[2]

[1]ФГОБУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия
300012, Тула, Проспект Ленина, 92
e-mail:. chem@tsu.tula.ru
[2]ФГУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, Пущино, Россия

НОЦ «Экобиотехнология», созданный в Тульском государственном университете в 2005 году, стал центром развития биотехнологического образования в Тульской области. Совместно с учеными Пущинского научного центра РАН и Пущинского естественнонаучного института создана многоуровневая система подготовки кадров в области биотехнологии.

Ключевые слова: научно-образовательный центр, экобиотехнология, многоуровневая подготовка кадров, учебно-научное сотрудничество

Научно-образовательный центр (НОЦ) «Экобиотехнология» создан в 2005 году в Тульском государственном университете (ТулГУ) при участии Института биохимии физиологии микроорганизмов РАН (ИБФМ РАН) и Пущинского естественнонаучного института (ПущГЕНИ) в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники». Основной целью НОЦ является содействие интеграции научного и образовательного потенциала ТулГУ, ПущГЕНИ и научно-исследовательских институтов Пущинского научного центра РАН, прежде всего ИБФМ РАН. Благодаря деятельности НОЦ в ТулГУ открыта и реализуется подготовка по направлениям «Биотехнология» и «Биология», созданы условия для обучения студентов по направлению «Экология». Основным элементом действующей системы являются творческие научные коллективы из студентов, магистрантов, аспирантов и сотрудников университета, академических институтов Пущинского научного центра, которые совместно выполняют исследования в области биотехнологии и смежных областей знаний. Студенты ТулГУ проходят практику, выполняют курсовые и квалификационные работы в лабораториях научных институтов Пущинского научного центра, после окончания университета выпускники поступают в магистратуру и аспирантуру ПущГЕНИ, обеспечивая молодыми кадрами научно-исследовательские институты РАН. Ежегодно 12-15 выпускников ТулГУ продолжают обучение в магистратуре и аспирантуре ПущГЕНИ. За десять лет деятельности НОЦ совместными коллективами выполнено более 15 научных проектов ФЦП, РФФИ, госзадания Минобрнауки РФ, причем около 50% фонда заработной платы расходовалось на поддержку молодых ученых, аспирантов, студентов. Важным направлением деятельности НОЦ является привлечение ведущих ученых Пущинского научного центра как лекторов и научных руководителей для студентов ТулГУ и ПущГЕНИ, что обеспечивает высокое качество образования. Выпускники-биотехнологи являются востребованными специалистами в Тульской области, они работают на предприятиях, связанных с производством пищевой, косметической, фармацевтической продукции, сельскохозяйственных инновационных компаниях и других областях производства, связанных с биотехнологией. Следует отметить, что деятельность НОЦ «Экобиотехнология» охватывает не только студентов-биотехнологов, но и химиков, биологов; так, 15% студентов, обучающихся по направлению «Химия», поступают в аспирантуру биотехнологической направленности. В настоящее время в Пущинском научном центре РАН работает более 20 молодых ученых (13 кандидатов наук), которые получили первую ступень образования в ТулГУ, а в университете – 12 молодых преподавателей (8 кандидатов наук), прошедших подготовку на базе НОЦ «Экобиотехнология», в том числе в ПущГЕНИ и академических институтах. Таким образом, многоуровневая подготовка кадров на стыке смежных областей знаний на базе НОЦ «Экобиотехнология», в которой задействованы университеты и академические институты, обеспечивает высокое качество биотехнологического образования и способствует закреплению молодежи в образовании и науке.

UDC 378.1+504.6

THE ROLE OF RESEARCH AND EDUCATION CENTRE ECOBIOTECHNOLOGY IN THE IMPROVEMENT OF BIOTECHNOLOGICAL EDUCATION QUALITY

V. A. Alferov[1], O. N. Ponamoreva[1], T. A. Reshetilova[2], A. M. Boronin[2]

[1]Tula State University, Tula, Russia
92 Lenin ave., Tula, 300012
e-mail:. chem@tsu.tula.ru
[2]Institution of Science G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS at the Pushchino Biological Research Center, Russia

Research and Education Center Ecobiotechnology, founded in Tula State University in 2005, has become the center of Biotechnological Education in Tula region. Together with well-known scientists from Pushchino Research Center, RAS and Pushchino State Institute of Natural Sciences, the center has created a multi-level system of personnel training in the field of Biotechnology.

Key words: education and research center, ecobiotechnology, multi-level training, educational and scientific cooperation

Research and Education Center (REC) Ecobiotechnology was founded in 2005 in Tula State University (TSU) in cooperation with the Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPM RAS) and Pushchino Institute of Natural Sciences (PuschGENI) within the framework of the Federal Target Programme for Research and Development in Priority Areas of Development of the Russian Scientific and Technological Complex. The main purpose of the REC is to promote the integration of scientific and educational potential of TSU, PuschGENI and research institutes of Pushchino Research Center, RAS, and of IBPM RAS in particular. Due to the REC, TSU has initiated training in the areas of Biotechnology and Biology and has created conditions for training of students specializing in Ecology. Creative research teams consisting of undergraduate, master's and postgraduate students and employees of the university and academic institutes of Pushchino Research Center, conducting research in the field of biotechnology and other related areas, are the main elements of the existing system. TSU students are engaged in practical training and writing term and qualification papers in the laboratories of the scientific institutes of Pushchino Research Center; graduate students usually enter master's and postgraduate programs at PuschGENI, thus providing young staff for research institutions of the Russian Academy of Sciences. Each year 12-15 TSU graduates continue their education, entering master's and postgraduate programs offered by PuschGENI. In ten years of operation REC's joint teams completed more than 15 research projects within the framework of FTP, RFBR projects and State Tasks of the Ministry of Education of the Russian Federation, with about 50% of payroll budget being spent to support young researchers, undergraduate and postgraduate students. One of the most important tasks of the REC is to hire leading scientists of Pushchino Research Center as lecturers and supervisors for students of TSU and PuschGENI, which provides high quality of education. Graduates, specializing in biotechnology are sought-after specialists in Tula region; they are working at the enterprises producing food, cosmetics and pharmaceutical products, as well as at agricultural innovation companies and in other production areas related to biotechnology. It should be noted that REC Ecobiotechnology attracts not only students specializing in Biotechnology, but also students studying Chemistry and Biology; thus, 15% of students studying Chemistry course, later enter the postgraduate program in Biotechnology. Currently, Pushchino Research Center RAS employs over 20 young researchers (13 Ph.D.s), who completed the first level of education in TSU and the university employs 12 young teachers (8 Ph.D.s) who completed training at REC Ecobiotechnology, PuschGENI and academic institutions. Thus, multi-level training at the interface of related sciences at REC Ecobiotechnology, which involves universities and academic institutions, provides high-quality Biotechnology Education and contributes to the promotion of youth involvement in education and science.

УДК 664.87

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МОДУЛЕЙ В ОП ВО ПО НАПРАВЛЕНИЯМ ПОДГОТОВКИ 19.03.04 И 19.04.04 ТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКЦИИ И ОРГАНИЗАЦИЯ ОБЩЕСТВЕННОГО ПИТАНИЯ

Бредихина О.В.

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)» Москва, Россия. 109004, Москва, ул. Земляной Вал, д. 73
e-mail bredihinaov@rambler.ru

Рассмотрены основные аспекты переработки сырья животного и растительного происхождения, биотехнологические основы, использующиеся при производстве пищевых продуктов. Показано значение биотехнологии как науки в подготовке студентов по технологическому направлению. Обосновано включение биотехнологических модулей в рабочие программы технологических дисциплин.

Ключевые слова: биотехнология, пищевые продукты, сырье животного и растительного происхождения, биотехнологические процессы, технологические дисциплины.

Сырье животного и растительного происхождения использующееся для производства пищевых продуктов является специфическим биологическим объектом. При воздействии на него определенных технологических и биотехнологических процессов получают готовые продукты. Переработка сырья заключается или в сохранении многокомпонентной полидисперсной сбалансированной системы (выработка продукции определенного качества) или в нарушении системы (получение гидрализатов, ферментных препаратов и т.д.).

Биологические объекты переработки являются многокомпонентными по химическому составу, полифункциональными, неоднородными по морфологическому строению, имеют капиллярно-пористую коллоидную структуру и под воздействием внешних факторов их структура и функционально-технологические свойства меняются.

Биотехнологическая обработка сырья представляет собой сложный комплекс воздействия микробиологических и ферментативных процессов на обрабатываемый биологический объект.

Таким образом, без знаний основ биотехнологии в современных условиях технологу сложно создавать пищевую продукцию с заранее заданными свойствами и определенного качества. Пищевые продукты могут классифицироваться на продукты, обогащенные определенными компонентами, аналоговые продукты, функциональные, формованные, биологически активные добавки к пище и т.д.

Многообразие форм и свойств готовых пищевых продуктов предопределяет их конструирование и использование различных видов воздействия, в том числе и биотехнологических.

Создается новое технологическое оборудование и внедряются новые технологические процессы обработки сырья, например 3-D печать при производстве пищевых продуктов, что определяет создание пищевых продуктов нового поколения.

В настоящее время для подготовки студентов по направлению 19.03.04 (бакалавры) и 19.04.04 (магистры) Технология продуктов и организация общественного питания в рабочие программы технологических дисциплин «Технология продукции общественного питания», «Пищевые добавки» и т.д. вводятся биотехнологические модули. В данные модули включены основные понятия биотехнологических процессов, сведения о свойствах сырья и готовых продуктов, способы биотехнологического воздействия на сырье, переработка отходов. Формирование профессиональных компетенций отвечающих современным требованиям производства позволяет вести подготовку студентов на высоком уровне.

Литература:
1. *Бредихина О.В., Бредихин С.А., Новикова М.В. Научные основы производства рыбопродуктов: учебное пособие – Спб.: Лань, 2016. 228 с.*
2. *Гришин А.С., Бредихина О.В., Помоз А. С., Пономарев В.Г., Красуля О.Н. Новые технологии в индустрии питания - 3-D печать//Вестник южно-уральского государственного университета. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2016. – т. 4 № 2. – С. 36 – 44.*

EXPERIENCE IN THE USE OF BIOTECHNOLOGICAL MODULES IN HIGHER EDUCATION GRADUATE PROGRAMS IN THE FIELDS OF STUDY 19.03.04 AND 19.04.04 FOOD TECHNOLOGIES AND CATERING ORGANIZATION

Bredikhina O.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State University of Technology and Management named after K.G. Razumovskiy"
73, Zemlyanoy Val str., Moscow, Russia, 109004
e-mail: bredihinaov@rambler.ru

The paper studies the main aspects of processing of animal and vegetable raw materials, biotechnological bases used in food production. The article shows the importance of biotechnology as a science in training students who major in technology. This paper justifies the inclusion of biotechnology modules in the working programs of technological disciplines.

Key words: biotechnology, nutrition product, animal and vegetable raw materials, biotechnological process, technological disciplines.

Raw material of animal and vegetable origin used for the food production is a specific biological object. When it is exposed to certain technological and biotechnological processes you get final products. Raw materials processing of raw materials involves either the preservation of balanced multicomponent polydisperse system (manufacture of products of certain quality) or violation of the system (obtaining hydrolyzates, enzyme preparations).

Biological objects of processing are multicomponent by its chemical composition, polyfunctional, heterogeneous by morphological structure, have a capillary-porous colloidal structure, and their structure and functional and technological properties change under the influence of external factors.

Biotechnological processing of raw materials is a complex exposure to microbiological and enzymatic processes on bioobject.

Thus, in current conditions it is almost impossible for a technologist without knowledge of the fundamentals of biotechnology to create food products with predetermined properties and of a certain quality. Foodstuff can be classified into products enriched in specific components, analog products, functional, molded, biologically active additives etc.

The diversity of forms and properties of ready-made meals determines their design and use of different types of impact, including biotechnological. More and more technological procedures of raw materials processing are introduced and new equipment is created, e.g. 3-D printing in food production that determines the creation of foodstuff of new generation.

At present, biotechnological modules are introduced in the working programs of technological disciplines: "Technology of products of public catering", "Nutrient additives" etc for bachelor's programme 19.03.04 and master's programme 19.04.04 Food technologies and catering organization. These modules include basic concepts of biotechnological processes, information about the properties of raw materials and final products, methods of biotechnological impact on raw materials, recycling waste. Formation of professional competence to meet the requirements of modern production makes it possible to train students to a high standard.

References:
1. Bredikhina O.V., Bredikhin S.A., Novikov M.V. Scientific basis of fish production: a tutorial - Spb .: Lan, 2016. 228 p.
2. Grishin A.S., Bredikhina O.V., Pomoz A.Z., Ponomarev V.G., Krasulya O.N. New technologies in the food industry - a 3-D printing // Bulletin of South Ural State University. A series of «Food and Biotechnology.» - 2016 – vol. 4 No. 2. - Pp 36 - 44.

.....

УДК 60:378

О НЕОБХОДИМОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ НАПРАВЛЕНИЯ ПОДГОТОВКИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ» В АГРАРНЫХ ВУЗАХ

Фауст Е.А., Ларионова О.С., Морозова О.В.

Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, Россия
410012, Саратов, Театральная пл., д. 1
e-mail: faustea@sgau.ru

Обоснована актуальность и необходимость подготовки специалистов-биотехнологов на базе аграрных вузов для решения таких задач АПК как повышение эффективности сельскохозяйственного производства и перерабатывающей промышленности.

Ключевые слова: направление подготовки «Биотехнология», агробиотехнологии, аграрный вуз.

Продовольственная безопасность и импортозамещение в системе АПК – важная часть национальной безопасности России [4]. Так, производство достаточного количества продовольственного сырья многие ученые видят в применении биологических технологий, в том числе агробиотехнологий [3].

Следовательно, на современном этапе повышение эффективности АПК невозможно без высококвалифицированных специалистов, способных реализовывать технологические процессы с использованием биологических объектов и процессов. Поэтому подготовка биотехнологов для АПК является важной и актуальной задачей системы высшего образования РФ.

Так, подготовка биотехнологов (бакалавриат, магистратура, аспирантура) для различных отраслей АПК ведется на базе Саратовского ГАУ им. Н.И. Вавилова. Развитая инфраструктура университета, а также активное сотрудничество с ведущими НИИ и предприятиями АПК позволяет будущему специалисту-биотехнологу приобретать практические навыки для работы на предприятиях АПК [1, 2].

Студенты привлекаются к фундаментальным, прикладным, поисковым исследованиям и научным разработкам в области агробиотехнологии на кафедре «Микробиология, биотехнология и химия» по следующим направлениям: исследование роли биоудобрений в повышении урожайности сельскохозяйственных культур; биотехнология получения альтернативного кормового белка; биотехнологические аспекты утилизации отходов агропромышленного комплекса; поверхностные структуры микроорганизмов и их использование в диагностических препаратах для ветеринарии; использование биотехнологических процессов для улучшения качества различных пищевых продуктов. Кроме того, взаимодействие в процессе обучения и выполнения совместных проектов со специалистами практически всех отраслей АПК (ветеринария, зоотехния, агрономия и др.) позволяет будущим биотехнологам адаптироваться к определенным сферам своей будущей профессиональной деятельности.

Следует отметить, что в настоящий момент направление подготовки «Биотехнология» считается непрофильным для аграрных вузов. Однако очевидно, что подготовку биотехнологов для решения проблем АПК наиболее целесообразно проводить на базе аграрных вузов.

Итак, не вызывает сомнения тот факт, что система биотехнологического образования в аграрном вузе способна решать многие задачи, связанные с обеспечением глобальной конкурентоспособности сельскохозяйственной отрасли, пищевой и перерабатывающей промышленности.

Литература:

1. *Миргородская О.А., Ларионова О.С. Современные информационные технологии в учебном процессе // Всерос. науч.-метод. чтения СтИК (филиала) БУКЭП: сб. мат.(Ставрополь, 24-26 нояб. 2015 г.). – Ставрополь, 2015. – С. 18-19.*
2. *Потемкина Е.Г., Фауст Е.А., Ковалева С.В. Некоторые направления компетентностного подхода в подготовке кадров по биотехнологии // Актуальные проблемы процесса обучения: модернизация аграрного образования: сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф. (Саратов, 19-20 сент. 2013 г.). – Саратов, 2013. – С. 113-114.*
3. *Римарева Л.В. Ресурсосберегающие биотехнологии в перерабатывающих отраслях // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2011. - № 1. – С. 35-37.*
4. *Семенова Н.И., Утяцкий С.П. Импортозамещение как основа обеспечения продовольственной безопасности России // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2015. – Т. 23. – С. 76-80. – URL: http://e-koncept.ru/2015/95260.htm (дата обращения 16.12.2016)*

.....

UDC 60:378

THE NEED TO IMPLEMENT MAJOR «BIOTECHNOLOGY» AT AGRARIAN UNIVERSITIES

Faust E.A., Larionova O.S., Morozova O.V.

Federal State Budgetary Educational University of Higher Education "Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov", Saratov, Russia
Teatralnaya Ploschad, 1, 410012, Saratov, Russia
e-mail: faustea@sgau.ru

The relevance and the need of specialists-biotechnologists` training at agrarian universities are reasoned at the present article. It helps to solve such agribusiness problems as increased efficiency of agricultural production and food processing industry.

Key words: major «Biotechnology», agricultural biotechnologies, agrarian university.

Food security and import substitution in the agribusiness system are important part of Russian national security [4]. Thus, many scientists see the production of sufficient quantity of food raw materials in the application

of biological technologies, including agricultural ones [3].

Therefore, at the present stage the agribusiness efficiency is impossible without highly skilled professionals able implementing technological processes using biological objects and processes. So, training of biotechnologists for agriculture is an important and urgent task of the higher education system of the Russian Federation.

Biotechnologists` training (bachelor, master and post graduate studies) for the various sectors of agribusiness is realized on the basis of the Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. The developed infrastructure of the University and active cooperation with the leading research institutes and agricultural enterprises enable future specialists-biotechnologists acquiring practical skills for working at the agribusiness enterprises [1, 2].

Students are involved in fundamental, applied and exploratory research and scientific developments in the field of agricultural biotechnology at the Department «Microbiology, Biotechnology and Chemistry» in the following areas: Study the role of bio-fertilizers to increase crop yields; Biotechnology in production of alternative feed protein; Biotechnological aspects of agribusiness waste recycling; Surface structures of microorganisms and their use in diagnostic veterinary medications; Use of biotechnological processes for quality improving of various foodstuffs. Besides, the interaction in the learning process and implementation of joint projects with the specialists from almost all sectors of agribusiness (veterinary medicine, animal science, agronomy, and others) allow future biotechnologists adapting to the specific areas of their future professional activity.

It should be noted that currently the major «Biotechnology» is considered non-major to agrarian universities. However, it is clear that biotechnologists` training for solving agribusiness problems should be efficiently carried out on the basis of agrarian universities.

So, there is no doubt that biotechnology education system at agrarian universities is able to solve many problems related to ensuring the global competitiveness of the agricultural sector and food processing industry.

References:

1. *Mirgorodskaya O.A., Larionova O.S. Modern information technologies in educational process // All-Russian scientific and methodical readings StIK (branch) Belgorod University of Cooperation, Economics and Law: conference information package (Stavropol, November 24-26, 2015). – Stavropol, 2015. – pp. 18-19.*
2. *Potemkina E.G., Faust E.A., Kovaleva S.V. Some directions of competence-based approach in biotechnology staff training // Current issues of learning process: modernization of agricultural education: information package of International scientific conference (Saratov, September 19-20, 2013). – Saratov, 2013. – pp. 113-114.*
3. *Rimareva L.V. Resource-saving biotechnologies in processing industries // Bulletin of the Russian agricultural science. – 2011. - № 1. – pp. 35-37.*
4. *Semenova N.I., Utyatsky S.P. Import substitution as a basis for ensuring food security of Russia // Scientific and methodical e-magazine «Concept». – 2015. – V.23. – pp. 76-80. - URL: http://e-koncept.ru/2015/95260.htlm (date of use 16.12.2016).*

.....

УДК 615.12

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПОДГОТОВКИ КАДРОВ В МАГИСТРАТУРЕ ПО НАПРАВЛЕНИЮ ПОДГОТОВКИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ» С НАПРАВЛЕННОСТЬЮ «ПРОИЗВОДСТВО ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

О.В. Топкова, В.А. Колодязная, Е.Н. Кириллова

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А
e-mail: oxana.topkova@pharminnotech.com

В соответствии с потребностями работодателей, на модульной основе разработана образовательная программа подготовки магистров по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология с направленностью «Производство иммунобиологических лекарственных средств». Цель образовательной программы – подготовка высококвалифицированных специалистов для биофармацевтической отрасли.

Ключевые слова: образовательная программа, иммунобиотехнологические лекарственные средства, магистратура, модуль.

Среди приоритетных направлений развития биотехнологии в Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Правительством РФ от 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8) названы биофармацевтика и биомедицина [1]. В рамках этого направления выделена тематика «Вакцины нового поколения». Для реализации инновационных технологических процессов производства иммунобиологических лекарственных средств (ИЛС) и внедрения «прорывных технологий» необходимо подготовить высококвалифицированные кадры современного уровня.

Разработка образовательных технологических программ требует ориентации на современного производителя. С целью выявления наиболее востребованных работодателями профессиональных функций был проведен опрос руководителей биофармацевтических предприятий и научно-исследовательских лабораторий и организаций по оценке значимости требований к профессиональной подготовке специалистов в сфере иммунобиотехнологического производства. На основании анализа результатов анкетирования мы составили перечень задач профессиональной деятельности и/или трудовых функций в области иммунобиотехнологии, наиболее востребованные ключевыми работодателями. Были определены требования к результатам освоения ООП магистратуры «Производство ИЛС», а также сформулированы требуемые наборы профессиональных компетенций, дополнительных по отношению к компетенциям выпускников по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология. На основании разработанных карт и паспортов профессиональных компетенций определены структура и содержание вариативных модулей ООП магистратуры по направлению подготовки Биотехнология с направленностью «Производство иммунобиологических лекарственных средств» в объеме, предусмотренном трудоемкостью стандарта [2]. Целью разработанной вариативной части образовательной программы является получение обучающимися знаний об основных принципах иммунобиотехнологических процессов и их использовании при получении традиционных и современных ИЛС, особенностях организации их производства с учетом требований российских и международных стандартов к качеству готового продукта. Кроме того, вводится обязательная педагогическая подготовка, для этого предусмотрено изучение дисциплин «Педагогика», «Психология и педагогика высшей школы», а также обязательная учебная педагогическая практика. Отличительной особенностью разработанной ООП является ее модульная структура, которая позволяет ежегодно обновлять программу без значительного деструктурирования учебного плана. Нами были определены рекомендуемые образовательные технологии реализации ООП магистратуры «Производство иммунобиологических лекарственных средств» Для достижения планируемых результатов предлагается использовать следующие образовательные технологии [3]: проблемное обучение, учебно-научные дискуссии, метод проектов, мини-конференции, деловые игры, электронное обучение.

Литература:

1. *Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Правительством РФ от 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8) [Электрон. ресурс]. // ГАРАНТ.РУ: информ.-правовой портал. URL: http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/ (дата обращения: 01.08.2016).*
2. *Об утверждении Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации) [Текст] : Приказ Министерства образования и науки РФ от 30.07.2014 г. № 871 [Электрон. ресурс]. // Портал Федеральных гос. стандартов высш. образования. URL: http://fgosvo.ru/fgosvo/95/91/7/144 (дата обращения: 15.06.2016).*
3. *Чернявская А.П., Байбородова Л.В., Харисова И.Г. Технологии педагогической деятельности. Часть I. Образовательные технологии: учебное пособие/ под общ. ред. А.П.Чернявской, Л.В.Байбородовой. — Ярославль; Изд-во ЯГПУ, 2012. - 311 с.*

UDC 615.12

FEATURES OF THE EDUCATIONAL PROGRAM OF TRAINING IN THE MAGISTRACY IN THE DIRECTION OF PREPARATION «BIOTECHNOLOGY» WITH THE ORIENTATION «PRODUCTION OF IMMUNOBIOLOGICAL PHARMACEUTICALS»

O. V. Topkova, V. A. Kolodyaznaya, E. N. Kirillova

Federal state budgetary institution of the higher education «St. Petersburg state chemical and pharmaceutical academy» of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia
197376, St. Petersburg, Professor Popov St., 14, lit. A
e-mail: oxana.topkova@pharminnotech.com

According to needs of employers, on a modular basis the educational program of training of masters for the direction of preparation 19.04.01 Biotechnology with an orientation «Production of immunobiological pharmaceuticals» is developed. The purpose of the educational program – training of highly qualified specialists for biopharmaceutical branch.

Key words: educational program, immunobiotechnological pharmaceuticals, magistracy, module.

Among the priority directions of development of biotechnology in the Comprehensive program of development of biotechnologies in the Russian Federation for the period till 2020 (it is approved by the Government of the Russian Federation of April 24, 2012 No. 1853p-P8) the biopharmaceutics and biomedicine are called [1]. Within this direction the subject of «A vaccine of new generation» is marked out. For realization of innovative technological processes of manufacture of the immunobiological pharmaceuticals (IP) and introduction of «breakthrough technologies» it is necessary to prepare highly qualified personnel of the modern level.

Development of educational technological programs demands orientation to the modern producer. For the purpose of identification of the professional functions which are most demanded by employers survey of heads of the biopharmaceutical enterprises and research laboratories and organizations for assessment of a significance of requirements to vocational training of experts in the sphere of immunobiotechnological production was conducted. On the basis of the analysis of results of questioning we made the list of tasks of professional activity and / or labor functions in the field of immunobiotechnology, the most demanded by key employers. Requirements to results of development of main curriculum of a magistracy «Production of IP» were defined, and also the required sets of professional competences, padding in relation to competences of graduates in the direction of preparation 19.04.01 Biotechnology are formulated. On the basis of the developed cards and passports of professional competences the structure and the maintenance of the main curriculum variable modules of a magistracy by the direction of preparation Biotechnology with an orientation «Production of immunobiological pharmaceuticals» in the volume provided by labor input of the standard [2] are determined. The purpose of the developed variable part of the educational program is obtaining by students knowledge of philosophy of immunobiotechnological processes and their use during the receiving traditional and modern IP, features of the organization of their production taking into account requirements of the Russian and international standards to quality of a finished stock. Besides, obligatory pedagogical preparation is entered, studying of disciplines «Pedagogics», «Psychology and pedagogics of the higher school», and also obligatory educational student teaching is for this purpose provided. Distinctiveness of the developed main curriculum is its modular structure which allows to update annually the program without the considerable destructuring of the curriculum. We defined the recommended educational technologies of realization of main curriculum of a magistracy «Production of immunobiological pharmaceuticals» for achievement of the planned results is offered to use the following educational technologies [3]: problem tutoring, educational and scientific discussions, method of projects, mini-conferences, business games, electronic tutoring.

References:

1. The comprehensive program of development of biotechnologies in the Russian Federation for the period till 2020 (it is approved by the The Government of the Russian Federation of April 24, 2012 No. 1853p-P8) [the Electron. resource] // GARANT.RU: inform. - the legal portal. URL: http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/ (date of the address: 01.08.2016).
2. About the approval of the Federal state educational standard of the higher education in the direction of preparation 06.06.01 Biological sciences (level of training of shots of the top skills) [Text]: The order of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation of 30.07.2014 No. 871 [the Electron. resource] //Portal Federal state. standards of the higher of the higher educations. URL: http://fgosvo.ru/fgosvo/95/91/7/144 (date of the address: 15.06.2016).
3. Chernyavskaya A. P., Bayborodova L. V., Harisova I. G. Technologies of pedagogical activity. Part I. Educational technologies: an educational grant / under a general edition of A. P. Chernyavskaya, L. V. Bayborodova. — Yaroslavl; YSPU Publishing house, 2012. - 311 pages.

УДК 378

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ОБРАЗОВАНИЯ В СФЕРЕ ПРИКЛАДНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ – ОБЩАЯ ЗАДАЧА ВЫСШЕЙ ШКОЛЫ И ПРИКЛАДНОЙ НАУКИ

Артамонова М.П., Бухтеева Ю.М., Ганина В.И., Чернуха И.М.

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского (ПКУ), Москва, Россия.
109029, Москва, ул. Талалихина, д. 31, ком. 29
m.artamonova@mgutm.ru

Представленная статья посвящена проблеме обеспечения качества высшего образования в Российской Федерации, о чем говорилось в Послании Президента Федеральному Собранию 12 декабря 2013 года. Сегодня многие образовательные и научно-исследовательские учреждения создают ассоциации, кластеры для объединения науки и образования, что в итоге должно улучшить качество образования и привлечь молодые кадры в науку.

Ключевые слова: учебно-научная ассоциация, образование, инновации, квалифицированные специалисты, прорывные научные направления, мясная и молочная промышленность.

Проблема обеспечения качества высшего образования в Российской Федерации является актуальной. В Послании Президента Российской Федерации Федеральному Собранию 12 декабря 2013 года В.В.Путин назвал качество вузовской подготовки и качество выпускников вузов «мощным стимулом развития страны» [1].

Значимой проблемой в России стала острая нехватка квалифицированных кадров в области пищевых технологий – технологов, инженеров, специалистов-аппаратчиков и пр.

Ответной реакцией государственных вузов на проявившиеся негативные тенденции стал поиск своего места в рамках госбюджетного финансирования и на рынке образовательных услуг. Все чаще образовательные и научно-исследовательские учреждения создают ассоциации, кластеры для объединения науки и образования, что в итоге будет улучшать качество образования, а также привлекать молодые кадры в науку. На пути к этому необходимо сформулировать некоторые общие критерии, или требования, которым должно удовлетворять классическое образование [2].

В широком смысле учебно-научный комплекс должен решить следующие основные задачи:

сформировать заинтересованный и подготовленный контингент студентов, оставаясь открытой и доступной системой;

обеспечить качественное образование, основанное на эвристических принципах и интеграции с современными научными исследованиями;

обеспечить лабораторно-информационную базу образования и проведения научных исследований;

сформировать систему воспроизводства кадрового потенциала комплекса;

обеспечить приемлемые траектории трудоустройства основной части обучающихся студентов, аспирантов, докторантов [3].

До сегодняшнего дня научно-исследовательские институты и центры проводили научные исследования самостоятельно, и на кафедрах в институтах и университетах также велась определенная научно-исследовательская работа. Однако стыковки работ не было. Конечно, многие студенты проходили практику в лабораториях научно-исследовательских институтов, но все это было удаленно, обмена опытом и знаниями между образовательными организациями и научными сотрудниками не было. К тому же, существует ряд междисциплинарных задач, решить которые в рамках одного института невозможно. Сегодня подобная ассоциация создана совместно с ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского (ПКУ)» и отраслевыми НИИ: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова», ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» и ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования». Эта ассоциация будет определять политику МГУТУ в области организации учебного процесса, методической работы, научно-исследовательской, консультационной и экспертно-аналитической работ.

Литература:

1. Послание Президента Российской Федерации Федеральному Собранию 12 декабря 2013 года. – http://www.kremlin.ru/news/19825.

2. Высшее образование в XXI веке. Подходы и практические меры // Всемирный статистический обзор по высшему образованию: Рабочий документ ЮНЕСКО. Париж. - 1998 г.
3. Борисов И. И., Запрягаев С. А. Тенденции развития образования в XXI веке // Вестн. Воронеж.гос. ун-та. Сер. Проблемы высшего образования. - 2000. - №1. - С. 12-28.

UDC 378

ENSURING QUALITY OF EDUCATION IN THE SPHERE OF APPLIED BIOTECHNOLOGY – THE GENERAL TASK OF THE HIGHER SCHOOL AND APPLIED SCIENCE

M. P. Artamonova, Y.M. Bukhteeva, V.I. Ganina, I.M. Chernucha

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of technologies and management named after K.G. Razumovsky (The First Cossack University).
109029, Moscow, 31, Talalikhina St., room 29
m.artamonova@mgutm.ru

The problem of the quality of higher education in the Russian Federation, as described in the Message of the President to the Federal Assembly, December 12, 2013, is reviewed. In this regard, today many educational and research institutions establish associations to bring together clusters of science and education, which ultimately will improve the quality of education, to attract young people to science.

Key words: educational and scientific association, education, innovation, staff, breakthrough research trends, meat and dairy industry.

The problem of ensuring quality of the higher education in the Russian Federation is urgent. In the Message of the President of the Russian Federation to Federal Assembly on December 12, 2013 Vladimir Putin called the quality of high school preparation and quality of university graduates «a powerful incentive of development of the country» [1].

The acute shortage of qualified personnel in the field of food technologies – technologists, engineers, specialists - processing machine operators and others has become a significant problem in Russia.

The response of state universities in the negative tendencies was to find their place within the framework of state budget financing and the market of educational services. Increasingly, educational and research institutions create associations, clusters to combine science and education, which ultimately will improve the quality of education, as well as attracting young people to science. On the way to this it is important to formulate some general criteria or requirements to be met by a classical education [2].

In a broad sense, the educational and scientific complex has to solve the following main objectives:

to create the interested and prepared contingent of students, remaining as an open and available system;

to provide the quality of education based on the heuristic principles and integration with modern scientific research;

to provide laboratory and information base of education and carrying out scientific research;

to establish a system of reproduction of the human resource capacity of the complex;

to provide the acceptable ways of employment of the main part of the studying students, post-graduate students, doctoral candidates [3].

Till today research institutes and the centers conducted scientific research independently, and a certain research work was also conducted at departments at institutes and universities. However, there was no collaboration in work. Of course, many students did practical training in laboratories of research institutes, but all this was far off, without any exchange of experience and knowledge between the educational organizations and research associates. Besides, there is a number of cross-disciplinary tasks which cannot be solved within one institute. Today the similar association is created together with Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of technologies and management named after K.G. Razumovsky" (The First Cossack University) and branch scientific research institutes: Federal State Funded Research Institution «The Gorbatov's All-Russian Meat Research Institute», Federal state budgetary scientific institution « All-Russian Research Institute of Dairy Industry» and Federal state budgetary scientific institution «All-Russian Research Institute of technology of conservation». This association will determine the policy MSUTM in the educational process, methodical work, research, consulting, and expert-analytical work.

References:

1. Message of the President of the Russian Federation to the Federal Assembly on December 12, 2013. – http://www.kremlin.ru/news/19825.
2. The higher education in the 21st century. Approaches and practical measures//World statistical review on the higher education: Brief of UNESCO. Paris. - 1998.
3. Borisov I. I., Zapryagayev S.A. Tendencies of development of education in the 21st century// Bulletin of Voronezh state university. Issue: Problems of the higher education. - 2000. - No. 1. - Page 12-28.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ В СОХРАНЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ПРИ РАСШИРЕНИИ ГОРНОЛЫЖНОГО КУРОРТА РОЗА ХУТОР (КРАСНАЯ ПОЛЯНА)

Козлова Н.И. , Рыбалко А.Е.

Сочинский институт (филиал) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», 354348, Сочи, ул. Куйбышева, 32.

Черноморское побережье Кавказа является уникальной субтропической территорией Российской Федерации. Ландшафты представлены растительными сообществами песчаных пляжей, колхидских болот, широколиственных, хвойных горных лесов, субальпийского пояса и альпийских лугов.

Основу разнообразной по составу флоры здесь составляет коренной колхидский флористический элемент, а также бореальный и древне-средиземноморский. Здесь содержится более 2000 видов сосудистых растений, в т.ч. 900 высокогорных. Из них 25% эндемиков (Солодько с соавт., 2006). В зоне зарегистрировано около 80 видов исчезающих растений. Эта зона является естественной лабораторией для получения уникальных знаний студентами биологических специальностей.

В настоящее время прорабатывается программа выполнения комплекса научно-исследовательских проектов, направленных на минимизацию экологических рисков, связанных с расширением международного горнолыжного курорта «Роза хутор» (Красная поляна в городе Сочи).

Эта программа основана на результатах работы лаборатории биотехнологии, в которой студенты проводят научные исследования, используя современные методы клеточной инженерии и вирусологии. В качестве биологического материала используются исчезающие и редкие растения Сочинского Причерноморья, как объект экологии (программа сохранения биоразнообразия – восстановление исчезающих ареалов) и материал для народного хозяйства (программа Wild flora from Russia, создание ландшафтов нового поколения на основе аборигенной флоры, производство новой для народного хозяйства России продукции – биоактивных субстанций нового поколения на основе аборигенных растений).

PROSPECTS OF STUDENTS' RESEARCH WORK USE IN BIODIVERSITY PRESERVATION DURING ROSAKHUTOR SKI RESORT (KRASNAYA POLYANA) EXTENSION

Kozlova N.I., Rybalko A.E.

Sochi branch of Peoples' friendship University of Russia, 354348, Sochi, Kuibysheva str., 32.

The Black Sea coast of the Caucasus is a unique subtropical area in Russia. Landscapes are presented with plant communities of sandy beaches, Colchis marshes, broadleaved, coniferous mountain forests, subalpine zone and alpine meadows.

The base of diverse flora is an aboriginal Colchis floral element as well as boreal and mediterranean. There are more than 2000 species of vascular plants including 900 mountainous. 25% of them are endemics (Solodko et al, 2006). About 80 endangered plants are registered in this area. The area is a natural laboratory for producing unique knowledge by students of biological faculties.

Nowadays a program of complex research projects execution is being worked out and it aimed at minimization of environmental risks related to Rosa Khutor international ski resort extension

The program is based on the results of the biotechnology laboratory where students are carrying out research using modern methods of cell engineering and virology. Endangered and rare plants of Black Sea Coast of Sochi

are used as a biological material. They are used as an environmental object (biodiversity preservation program - endangered habitat restoration) and a material for the national economy (Wild flora from Russia Program, creation of new generation landscapes on the base of aboriginal flora, production of new generation bioactive substances on the base of aboriginal flora which is new for the Russian national economy.

УДК 811.1: 378

ИНТЕГРАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО И ЯЗЫКОВОГО ОБРАЗОВАНИЯ КАК НЕОБХОДИМАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПРОЦЕССА ПОДГОТОВКИ СОВРЕМЕННОГО СПЕЦИАЛИСТА

Дворецкий Д.С., Дворецкая Е.В.

Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия
392000, Тамбов, ул. Советская, д. 106
e-mail: dvoretsky@tambov.ru

Интеграция языковых и профессиональных дисциплин биотехнологического профиля позволит подготовить будущих специалистов к активному получению и анализу информации на иностранном языке, а также к международному сотрудничеству между научно-исследовательскими и образовательными центрами, без которого, по сути, невозможно современное развитие биотехнологий.

Ключевые слова: подготовка специалиста; биотехнологическое образование; изучение иностранного языка.

На сегодняшний день биотехнология является одним из передовых и наиболее динамично развивающихся направлений науки. Не последнюю роль в этом развитии играет сотрудничество между учеными из разных стран мира как в рамках крупных международных программ (к примеру, сотрудничество России со странами ЕС по программе «Горизонт 2020»), так и в рамках двусторонних контактов между исследовательскими и образовательными центрами. В связи с этим актуальным становится вопрос о подготовке будущих специалистов-биотехнологов к работе в интернациональных коллективах, с международными партнерами и, в частности, вопрос о языковой подготовке студентов. В последнее время было внесено много изменений в образовательные стандарты, однако эти изменения практически не коснулись требований к уровню и качеству подготовки будущих биотехнологов по иностранному языку.

Согласно ФГОС 3+, выпускник бакалавриата должен обладать «способностью к коммуникации в устной и письменной формах на русском и иностранном языках для решения задач межличностного и межкультурного взаимодействия» (общекультурная компетенция). Лишь на уровне магистратуры знание иностранного языка становится общепрофессиональной компетенцией, владение которой подразумевает готовность выпускника «к коммуникации в устной и письменной формах на государственном языке Российской Федерации и иностранном языке для решения задач профессиональной деятельности». В реальности это воплощается в то, что студенты изучают курс общего иностранного языка максимум на 2 курсе университета, и лишь в магистратуре приступают к освоению специальной терминологии и дискурса будущей профессии. При такой расстановке приоритетов можно сделать вывод, что студентами бакалавриата язык изучается только для личного общения, и им не требуется иностранный язык в повседневной учебной и будущей профессиональной деятельности. По нашему мнению, это в корне неверно, особенно в столь динамично развивающихся отраслях как биотехнология, новые знания о которой формируются специалистами со всего мира, и студенты должны активно использовать иностранный язык для получения профессиональной информации. Профессиональный рост и дальнейшее самообразование невозможны без развития познавательных и исследовательских умений с использованием ресурсов на иностранном языке. При изучении иностранного языка в вузе одним из наиболее значимых моментов является формирование у обучающихся академической компетенции на иностранном языке: развитие способности осуществлять исследования в области профессиональных и научных интересов и интегрировать знания из различных областей с целью решения профессиональной проблемы.

Таким образом, для качественной подготовки современного специалиста в области биотехнологии, владеющего наиболее актуальными знаниями об этой сфере, было бы целесообразно закрепить в образовательном стандарте:

- непрерывность и обязательность изучения иностранного языка на этапах бакалавриата и магистратуры, увеличив количество часов, отводимых на его изучение и, тем самым, «закрыв разрыв» на 3-4 курсе;
- нацеленность языковой подготовки на решение профессиональных задач в области биотех-

нологии уже на этапе бакалавриата (углубленное изучение профессиональной терминологии и специальной лексики);

- интеграцию содержания языковых курсов и дисциплин биотехнологического профиля, коррелируя темы и ориентируя студентов на использование иноязычных источников информации при подготовке к занятиям, в курсовых и дипломных работах и т.д.

UDK 811.1: 378

INTEGRATION OF BIOTECHNOLOGICAL AND LANGUAGE EDUCATION AS AN ESSENTIAL COMPONENT OF A CONTEMPORARY SPECIALIST'S TRAINING

Dvoretsky D. S., Dvoretskaya E. V.

Tambov State Technical University, Tambov, Russia
ul. Sovetskaya, 106 Tambov 392000
e-mail: dvoretsky@tambov.ru

Integration of language and professional disciplines in the field of biotechnology will enable training future professionals to actively obtain and analyse information in a foreign language, as well as participate in international cooperation between research and educational centres, without which, in fact, a modern development of biotechnology would be impossible.

Key words: training; biotechnology education; foreign language learning.

Today, biotechnology is one of the leading and most dynamically developing areas of science. Not the last role in this development is played by the cooperation between scientists from different countries within major international programmes (for example, Russia's cooperation with the EU within «Horizon 2020») and bilateral contacts between research and educational centres. In this regard, the question of the training of future specialists in biotechnology to work in international teams, with international partners becomes relevant and, in particular, the question of language training. Recently, many changes have been made in educational standards; however, these changes had practically no effect on the requirements to the level and quality of training of future biotechnologists in a foreign language.

According to the federal educational standard 3+, undergraduate students should possess «the ability to communicate in oral and written forms in Russian and foreign languages for solving problems of interpersonal and intercultural communication» (general cultural competence). Only at the postgraduate level the knowledge of a foreign language is regarded as a general professional competence, the possession of which implies the readiness of graduates «to communicate in oral and written form in the official language of the Russian Federation and a foreign language for the solution of professional tasks». In reality, it means that students will study a general course of foreign language maximum in the 2nd year of university, and only at the master's level will start mastering specialized terminology and discourse of the future profession. With the priorities set in such a manner, it can be concluded that the undergraduate students only study language for personal communication and do not need a foreign language in everyday academic and future professional activities. In our opinion, it is fundamentally wrong, especially in such emerging industries as biotechnology, new knowledge about which are formed by specialists from all over the world, and students must actively use a foreign language to obtain professional information. Professional growth and further self-education is impossible without the development of cognitive and research skills using resources in a foreign language. When learning a foreign language in university one of the most important aspects is the formation of students' academic competence in a foreign language: developing the ability to carry out research in the field of professional and scientific interest and to integrate knowledge from different fields with the aim of solving professional problems.

Thus, to ensure the quality of training of contemporary specialists, equipped with the most relevant knowledge about biotechnology, it would be advisable for the following principles to be formalised in educational standards:

- the continuity and commitment of learning a foreign language at undergraduate and postgraduate levels, increasing the number of academic hours and, thus, «closing the gap» in the 3rd and 4th years of study;

- the focus of language training on professional tasks in the field of biotechnology at undergraduate level (advanced study of professional terminology and the specialized vocabulary);

- the content integration of language courses and biotechnology disciplines, correlating topics and encouraging students to use foreign-language sources of information in preparing for classes, course and diploma projects, etc.

УДК 573.6.086.83+577.21

ПРЕЕМСТВЕННОСТЬ ПРЕПОДАВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ОТ ШКОЛЫ ДО МАГИСТРАТУРЫ

Литвина Л. А., Маренков В.Г.

ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ Россия, 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова 162, Биолого-технологический факультет.
e-mail:uni01@ngs.ru

Рассматриваются вопросы преподавания биотехнологии в школе, в виде факультативных курсов, и в университете, как дисциплина биотехнологии переработки с/х продукции и отходов с/х производств.

Ключевые слова: образование, программы биотехнологии, школа, университет.

В школах преподавание биологии ведется в 5-9 классах. Обширная программа включает большое количество сведений о представителях различных царств живой природы. Рассматриваются вопросы, касающиеся особенностей растений, животных, грибов, бактерий, связей между представителями различных царств, видообразование и другие важные вопросы, показывающие фундаментальность живого мира.

На этом фоне полной противоположностью биологии представляется биотехнология. Она не только предлагает изменить всех и все вокруг, но и показывает приемы, которые надо применить для этих радикальных изменений. Не каждый ученик готов к такому резкому повороту в своем сознании от устоявшихся догм к их пересмотру.

Нами в течение ряда лет по просьбе руководства школ проводились занятия по биотехнологии и читался курс лекций по этому предмету. Курс был адаптирован к ученикам старших классов. В первую очередь, его посещали учащиеся, которые готовились к поступлению в вузы по биологическим и медицинским специальностям. На выбор этого факультативного курса влияла в школе № 5 поселка «Кольцово» близость биотехнологического предприятия «Вектор», на котором трудится большинство родителей этих школьников. На выбор биотехнологии учениками школы №167, по-видимому, влиял расположенный рядом аграрный университет, в который многие ученики пришли по окончании школы. Целью нашего курса в школах было – осветить достижения биотехнологии, перспективы развития и проблемы; познакомить учащихся с биотехнологией – научно-технической отраслью, находящейся на стыке многих современных наук, прежде всего – молекулярной биологии, генетики, биохимии, микробиологии, а также с приемами биотехнологии, в частности с генетической инженерией. После окончания курса с учащимися проводили собеседование, на котором они показали хорошее понимание проблем. Считаем, что прослушивание данного курса способствует более легкой адаптации учеников к последующему обучению в вузе, т.к. они учатся смотреть на многое привычное другими глазами.

В Новосибирском государственном аграрном университете преподавание основ биотехнологии продолжается много лет. Первые изменения в программах произошли в 80-ые годы, когда курс «Микробиология» был переименован в «Микробиология с основами биотехнологии». В то время в г. Новосибирске активно работало одно из предприятий микробиопрома - Бердский завод, производящий продукцию микробного синтеза (ферменты для животноводства, для силосования кормов, заменители цельного молока, биологические средства защиты растений, и др.), при посещении которого студенты знакомились с практической стороной получения биотехнологической продукции. После изменения программы и переименования предмета в «Микробиология с основами иммунологии», курс «Микробиотехнология» для зооинженеров был представлен в виде факультатива и посещение его студентов всегда было и остается активным.

Далее в образовательную программу института был включен курс «Биотехнология в растениеводстве» для студентов, обучающихся по направлению «Технология производства и переработки с/х продукции», в котором подробно рассматривались все вопросы, связанные с получением генно-модифицированных растений, обсуждались возможные плюсы и минусы данной проблемы. Через несколько лет курс был заменен на другим – «Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции». Здесь можно рассматривать самый широкий круг вопросов в историческом аспекте, начиная от биотехнологии наших предков до получения антибиотиков, пробиотиков, кисломолочных продуктов. Поскольку этот предмет преподается у студентов, обучающихся по направлению, связанному с переработкой с/х продукции, рассматриваются такие важные вопросы как переработка отходов животноводства и растениеводства, а также других перерабатывающих производств, и превращение их во вторичные сырьевые ресурсы. По

данному курсу нами создано Электронное учебное пособие, в котором освещаются все темы курса и которое с большим интересом воспринимается студентами. Со следующего года курс будет называться «Микробиотехнология», поскольку дополнительно к нему читаются еще несколько курсов по биотехнологии. Это «Введение в биотехнологию», «Сельскохозяйственная биотехнология». Создан в электронном виде практикум «Эмбриотехнология для лабораторных животных», который позволяет не только представить, но и увидеть все производимые биотехнологические процессы своими глазами.

В этом году впервые была сформирована группа магистрантов, обучающихся по программе «Биотехнология», программа утверждена высшими инстанциями. Кроме теоретического курса, предполагается и большая практическая работа обучающихся. на одной из дисциплин - «Микробиотехнология». Здесь рассматриваются объекты биотехнологии, свойства микроорганизмов, необходимые для их масштабного производства, изучаются потребности микроорганизмов в питательных веществах, особенности культивирования микроорганизмов, и др.

Очень важно, что часть занятий, связанных с практическими вопросами, магистранты смогут изучать непосредственно на предприятиях биопрома – «Векторе» и на «Бердском заводе микробиологических препаратов».

Все сказанное дает возможность показать учащимся школ, студентам и магистрантам университета огромный потенциал, который несут с собой достижения биотехнологии и их внедрение в практику. Необходимо помочь молодому поколению получить знания фундаментальных основ биотехнологии и путей их применения в жизни общества, в защите окружающей среды; в получении новых медицинских препаратов и препаратов сельскохозяйственного назначения, что поможет им в дальнейшем к профессиональному самоопределению.

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 378.147

ФОРМИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ЗНАНИЙ ИНЖИНИРИНГА СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Понкратова С.А., Кошкина Л.Ю., Понкратов А.С., Якушев И.А.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия
420015, Казань, ул. К. Маркса, 68
e-mail: studchemcyb@gmail.com

Показан опыт внедрения интегрированного курса в программу обучения магистров по направлению 19.04.01 Биотехнология.

Ключевые слова: биотехнология; инжиниринг; компетентностный подход; магистерские программы

С целью развития кадрового потенциала в рамках целевой программы «Развитие биотехнологии в Республике Татарстан на 2010 – 2020 годы»[1] в ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» ведётся подготовка магистров по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология. Для подготовки конкурентоспособного выпускника, который бы располагал отличительными навыками и умениями на рынке труда, необходимо становление профессиональных способностей и овладение рядом компетенций:

1. способность использовать современные информационные технологии для сбора, обработки и распространения научной информации в области биотехнологии и смежных отраслей, способность использовать базы данных, программные продукты и информационно-телекоммуникационные ресурсы (ОПК - 5);
2. готовность к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности (ОПК - 6);
3. способность к проведению технико-экономического анализа производства и составлению технико-экономической документации (ПК - 8);
4. способность к разработке системы менеджмента качества биотехнологической продукции в соответствии с требованиями российских и международных стандартов качества (ПК - 10).

Для реализации этих компетенций в учебный план обучения магистров был включен курс «Инжиниринг биотехнологических процессов и систем».

Инжиниринг – это совокупность проектных и практических работ, относящихся к области инженерно-технической науки. В широком смысле слова он включает: консультационный инжиниринг, связанный, главным образом, с интеллектуальным вкладом, предоставление услуг в целях проектирования, разработки планов и мониторинга работ; а также технологический инжиниринг, состоящий в предоставлении заказчику технологий.

Инжиниринг биотехнологических процессов и систем – это совокупность интеллектуальных видов деятельности, имеющей своей конечной целью получение наилучших (оптимальных) результатов от капиталовложений или иных затрат, связанных с реализацией проектов биотехнологической направленности за счет наиболее рационального подбора и эффективного использования материальных, трудовых, технологических и финансовых ресурсов в их единстве и взаимосвязи; а также методов организации и управления, на основе передовых научно-технических достижений, с учетом конкретных условий и проектов.

Для технологических и проектных расчетов биотехнологического оборудования и технологических систем магистры используют современные CAD/CAM/CAE/PDM программные комплексы, которые позволяет выполнять, анализировать важнейшие инженерные расчеты и обмениваться ими, работать в команде[2].

На следующем этапе, где магистранты создают и выбирают оптимальный план развития биотехнологического бизнес-проекта, разрабатывают финансово-экономический и бизнес-план, а также оценивают инвестиционную привлекательность проектов в рамках курса, используются имитационно-аналитические автоматизированные системы управления проектами, которые позволяют:

1. создавать финансовые модели проекта (основываясь на параметрах выбранного технологического решения);
2. определять на основе первого шага необходимых капитальных вложений (моделирование различных вариантов финансирования, обоснование для потенциальных участников финансирования);
3. оценивать инвестиционные показатели проекта;
4. создавать документ бизнес-плана

Таким образом, использование в курсе «Инжиниринг биотехнологических процессов и систем» современных информационных технологий и программных комплексов в процессе обучения и подготовки магистров способствует выработке новых подходов при формировании и развитии профессиональных компетенций и в конечном итоге приводит к более высокому результату в обучении.

Литература:
1. Целевая программа «Развитие биотехнологии в Республике Татарстан на 2010-2020 гг.» URL: http://prav.tatar.ru/rus/file/pub/pub_49909_enc_5094.zip5 (дата обращения:18.12.2016)
2. Кошкина Л.Ю., Понкратова С.А. Современные информационные технологии в курсе «Инжиниринг биотехнологических процессов и систем» // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, №. 23. – С. 106-109.

.....

UDC 378.147

DEVELOPMENT OF THE INNOVATION AND MANUFACTURING BIOTECHNOLOGY INFRASTRUCTURE IN THE TATARSTAN REPUBLIC

Ponkratova S.A., Koshkina L.Yu., Ponkratov A.S., Jakushev I.A.

Kazan National Research Technological University, Department of Chemical Cybernetics, Kazan, Russia
Karl-Marx-Str. 68, 420015
e-mail: studchemcyb @gmail.com

Experience of including the integrated study course in an educational master's program 19.04.01 Biotechnology is performed in this article.

Key words: Biotechnology, engineering, competency-based approach, masters programs.

Training and educating of master degree students are realized in the Kazan National Research Technological University within the master's program "19.04.01 Biotechnology" with the purpose to human resource development for the target project "The development of Biotechnologies in Republic of Tatarstan in 2010-2020" [1].

In the study process the student to be competitive expert should acquire these professional abilities and get the competences:

1. ability to use modern information technologies for enhanced collection, processing and sharing of scientific data in the biotechnology and related sectors. Ability to use data bases, software products and IT networks;
2. readiness to protect and commercialize intellectual property;
3. ability to studied technical and financial parameters and prepare engineering-and-economical papers;
4. ability to develop the quality management system of biotechnologies production according to the Russians and international demands for the quality standards.

The course "Engineering of biotechnological processes and systems" was integrated to the study program to achieve the above competencies.

The discipline includes a vast range of specialized fields of engineering: consulting engineering, intellectual property rights, services of the engineering design and the works monitoring, technology engineering.

The engineering of biotechnological processes and systems consist of different intellectual activities which allow obtain the best (optimal) results from investment cost and others outlays in biotechnological project.

The master's students use modern IT systems as CAD/CAM/CAE/PDM for design study of biotechnological equipment[2].

In the following level where masters students create and choose optimal development plan of biotechnological project with special software products to:

1. prepare business plan (according to chosen technological parameters);
2. prepare financial plan (modeling different conditions and all outlays);
3. identify the investment attractiveness of the project;
4. export project in the special forms.

Consequently the use of these modern information technologies and software products promotes the new approaches in acquiring knowledges and getting the competences which show higher results of educational program.

References:
1. Target programme «The development of Biotechnologies in Republic of Tatarstan in 2010-2020» URL: http://prav.tatar.ru/rus/file/pub/pub_49909_enc_5094.zip5 (last accessed date: 18.12.2016)
2. Koshkina L.Yu., Ponkratova S.A. Modern information technologies in the course «Engineering of biotechnological processes and systems» // Herald of technological university – 2015. – V. 18, №. 23. – P. 106-109.

УДК 573.6.086, 37.033, 37.031.4

ПРОЕКТНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ В ШКОЛЕ. ИНЖЕНЕРНЫЕ ПРОЕКТЫ В ОБЛАСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Мальцевская Н.В. [1], Караскова Н. [2]

[1] Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение города Москвы «Воробьевы горы» (ГБПОУ «Воробьевы горы») Москва, Россия, maltsevskaya@yandex.ru
[2] Факультет Естественных наук, Университет Градец Кралове (UHK), Градец Кралове, Чешская Республика, natalie.karaskova@uhk.cz

Работа посвящена проблеме проектно-исследовательской работы инженерного направления в основной школе в химико-биологических классах путем реализации проектов биотехнологической направленности.

Ключевые слова: Проектная деятельность, биотехнологический инженерный проект, биотехнологическая ассимиляция углекислого газа.

В настоящее время в средней школе большое внимание уделяется подготовке инженерных проектов. Также в школах появилось разделение в старших классах по направлениям – химико-биологическое, физико-математическое и т.д. Проблема определения тематик инженерных проектов у обучающихся в настоящее время является крайне актуальной. Одним из вариантом решений данной проблемы в химико-биологических классах является выполнение инженерных проектных работ биотехнологической¬¬ направлении.

Биотехнология – пример органичной интеграции различных дисциплин, таких как биология, экология, техника и технология и т.д. Основной сложностью является мотивирование обучающихся на выполнение

инженерных проектов. Сложность заключается в том, что ребята, поступающие на химико-биологическое направление недостаточно информированы о способах и методах работы данного направления, и о том, что львиная доля научных достижений в данной области связана именно с инженерными разработками. Ниже приведен пример инженерно-исследовательского проекта в области биотехнологии, выполненного в химико-биологическом классе.

Проект «Альгобиопоглотитель углекислого газа» посвящен разработке аппарата для поглощения углекислого газа на основе жизнедеятельности микроводорослей для замкнутых помещений. Проект выполнен в малой группе, состоящей из трех участников. Каждый из участников отвечал за свою часть работы (которая по своей сути являлась самостоятельным законченным проектом):

1. Влияние углекислого газа на человека, экспериментальное исследование концентрации углекислого газа в различных помещениях школы, рекомендации по снижению концентрации углекислого газа в школе;

2. Экспериментальное исследования влияния спектрального состава света на рост микроводорослей, рекомендации по оснащению осветительными элементами аппарата для поглощения углекислого газа.

3. Теоретическое исследование различных видов аппаратов по культивированию биомассы микроводорослей (фотобиореакторов).

Далее разработка, конструирование и сборка аппарата в соответствии с рекомендациями всех участников проекта.

Проект успешно демонстрировался на различных конкурсах и на международной выставке инноваций.

Основные итоги работы – проведенные обучающимися школы настоящие исследования, результаты которых легли в основу работы аппарата, который был разработан и изготовлен самими участниками проекта.

Знания, полученные в ходе курса школьной программы, были достаточны для освоения новых методик, необходимых для реализации проекта. В результате работы над проектом обучающиеся получили большой опыт не только с инженерно-научной точки зрения, но и опыт презентации продукта, защиты своих идей, опыт работы в команде.

UDC 573.6.086, 37.033, 37.031.4

PROJECT AND RESEARCH ACTIVITY IN THE SCHOOL. ENGINEERING PROJECTS IN BIOTECHNOLOGY

Nadezhda Maltsevskaya[1], Karásková Natálie[2]

[1] State budget professional educational institution of Moscow city «Vorobyovy Gory» (Vorobyovy Gory) Moscow, Russia, maltsevskaya@yandex.ru
[2] Faculty of science, University of Hradec Králové (UHK), Hradec Králové, Czech Republic

The article is about problems of project and research work of engineering in the primary school in chemistry and biology classes through the implementation of projects in the biotechnology direction.

Key words: Project activities, biotechnology project engineering, biotechnology assimilation of carbon dioxide.

Currently in secondary school much attention is paid to engineering projects. Also in schools there was a division in high school in areas such as chemical and biological, physic-mathematical, etc. the problem of determining the subjects of engineering projects from students at the present time is extremely important. One of the solutions to this problem in chemistry and biology classes is the implementation of the engineering design work of the biotechnology direction.

Biotechnology – an example of integration of various disciplines such as biology, ecology, technology, etc. the Main difficulty is the motivation of students to perform engineering projects. The difficulty in the fact that the students coming on a chemical-biological direction is not well informed about the ways and methods of work in this direction, and that the lion's share of scientific achievements in this field connected with engineering. Below is an example of an engineering research project in the field of biotechnology, is made in chemical-biological class.

The project «Algobioassimilator carbon dioxide» is devoted to the development of the apparatus for the absorption of carbon dioxide on the basis of the ability of microalgae in enclosed spaces. The project was implemented in a small group consisting of three participants. Each participant is responsible for their part of the work (which in essence was an independent complete the project):

1. Effect of carbon dioxide on human, experimental studies of carbon dioxide concentration in different areas

of the school, recommendations for reducing the concentration of carbon dioxide in the school;

2. Experimental study of the effect of spectral light composition on the growth of microalgae, recommendations for equipment lighting elements of the apparatus to absorb carbon dioxide.

3. Theoretical study of various types of devices for the cultivation of microalgae biomass (photobioreactors).

Further development, construction and assembly of apparatus in accordance with the recommendations of all participants of the project.

The project was successfully demonstrated at various competitions and at the international exhibition of innovations.

The main results of the work carried out by students of the school the present studies, the results of which formed the basis of the operation of the machine, which was developed and manufactured by the participants of the project.

The knowledge gained during the course curriculum was sufficient for the development of new techniques necessary for the project. As a result of work on the project, the students got a lot of experience not only with engineering and scientific point of view, but also the experience of product presentation, protection of their ideas, experience in the team.

.....

УДК 37.016:573.6.086.83

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ШКОЛЕ

Иванкова А.В., Кадысева А.А.

ИПИ им. П.П. Ершова (филиал) ФГАОУ ВО ТюмГУ
Ишим, Россия 627756, Тюменская обл. Ишим, ул. Ленина, д. 1.
e-mail: jyrovskaja@mail.ru

В статье речь идет о проблемах школьной подготовки, профессиональной ориентации учащихся к работе в области биотехнологии и путях решения указанной проблемы.

Ключевые слова: биотехнология, содержание образования, компетенции.

Чрезвычайная актуальность развития современных прикладных наук не вызывает сомнения, в этом процессе немаловажная роль отводится подготовке высококвалифицированных кадров, и эта работа должна начинаться до поступления абитуриентов на соответствующие факультеты. По исследованиям Устиновой Н.Б., около половины студентов выбирают будущую профессию не осознанно, часто полагаясь на мнение родителей или руководствуясь иными внешними причинами, что имеет негативные последствия при обучении и последующей профессиональной деятельности (Устинова, 2016). Профессия биотехнолог имеет высокий рейтинг среди выпускников и считается престижной однако при её выборе и успешности обучения в ВУЗе, существует ряд сложностей, которые закладываются при изучении биологии в школе.

В первую очередь, это общая неосведомленность старшеклассников и общества в целом о достижениях современной биотехнологии во всех сферах жизни и деятельности человека: в медицине, промышленном производстве, сельском хозяйстве, прикладной экологии, биоэнергетики, биоэлектронике. Данная проблема во многом обусловлена тем, что в содержании школьного биологического образования прикладные «биотехнологические» вопросы представлены весьма ограниченно, например, в школьных учебниках по Биологии за 9 класс отводится 2-3% материала.

Недостаточная сформированность предметных компетенций, таких как знание структуры и пространственной организации основных компонентов живой клетки; закономерностей роста, наследственности и изменчивости, основных биохимических процессов, как проблема подготовки биотехнолога, была обозначена Красноштановой А.А. и Разумовой Т.М. (Красноштанова, 2014). Повышение качества биологического образования и уровня сформированности у обучающихся указанных компетенций возможно только путем повышения профессионального уровня учителя биологии.

Исходя из вышесказанного, мы предполагаем следующие пути решения данной ситуации:

1. Повышение уровня знаний о современной биотехнологии учителей школы, что может быть достигнуто путем расширения данных вопросов в содержании курсов повышения квалификации и профессиональной переподготовки, издания методической литературы для подготовки к урокам по разделам генетики и молекулярной биологии.

2. Введение в содержание школьного образования более полной информации о методах молекулярной биологии и биотехнологии, их практическом применении в разнообразных сферах деятельности человека.

3. Использование ресурсов внеклассной работы по биологии, с целью расширения кругозора обучающихся по практическому применению знаний и достижений биологии.

Литература:
1. Красноштанова А.А. Формирование входных компетенций учащихся в средней школе для обучения в бакалавриате по направлению «биотехнология» [Текст]/ А.А. Красноштанова, Т.М. Разумова // межд. научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни»: материалы конференции (Москва, 18-20 марта 2014 г.). – Москва, 2014. - С. 549-550.
2. Устинова Н.Б. К проблеме осознания студентами вузов правильности выбора профессии / Н.Б. Устинова // Научный альманах. – 2016. - N 7-2(21). – С. 256-258.

BIOTECHNOLOGY IN SCHOOL

Ivankova A. V., Kadyseva A.A.

Teachers' Training Institute named after P.P. Ershov (Branch) of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Vocational Education «Tyumen State University» (Ishim, Russia)
Ishim Pedagogical Institute named after P.P. Yershov (branch) Tyumen State University 1, Lenina str., Ishim, Russian Federation e-mail: jyrovskaja@mail.ru

This article describes about problems of the school training, and career guidance for learners to work in the biotechnology and ways to address this problem.

Key words: biotechnology, educational content, competence.

There is no doubt about the extreme urgency of the modern applied science development. Training of the highly qualified personnel has an important role in this process. Moreover, this work should begin before admission entrants to respective faculties. According to the researches of Ustinova N.B., about half of the students have not consciously chosen a future profession, often relying on the parents' opinion or guided by other external reasons that has negative consequences for the training and subsequent professional activity (Ustinova, 2016). The profession of the biotechnologist has a high ranking among graduates and is considered as prestigious, but there are a number of difficulties for the choosing and successful teaching at higher educational institutions, which are laid when studying the biology at school.

First and foremost, this is a general lack of awareness of high school students and the society in general about the achievements of the modern biotechnology in all spheres of life and human activities: in the medicine, industrial production, agriculture, applied ecology, bioenergetics, and bioelectronics. This problem is largely due to the fact the applied 'biotechnological' issues are very limited represented in the content of the school biological education, for example, in school textbooks on the Biology for grade 9 only 2-3% of the material has allocated for the biotechnology.

The insufficient maturity level of the subject competences, such as knowledge of the structure and spatial organization of the main components of a living cell; patterns of growth, of heredity and variation of basic biochemical processes was identified by Krasnoshtanova A.A. and Razumova T.M. as a problem of the biotechnology training. (Krasnoshtanova, 2014). Improving a quality of the biological education and the maturity level of these competencies among students is only possible by raising the professional level of biology teachers.

Based on the foregoing, we suggest the following solutions for this situation:

1. Increasing the level of knowledge of teachers about the modern biotechnology, which can be achieved through the expansion of these issues in the content of training courses and the professional retraining, the publication of methodological literature for the preparation of lessons on the topics of genetics and molecular biology.

2. The introduction into the school curriculum the more complete information on the methods of molecular biology and biotechnology and their practical application in various spheres of the human activity.

3. Using extracurricular activities on the biology in order to expand the horizons of learners on the practical application of the biology knowledges and achievements.

References:
3. Krasnoshtanova A.A. The formation of the input competencies of secondary school students to study on the bachelor course by the 'biotechnology' direction [Text]/ A.A., Krasnoshtanova T.M. Razumova // THE INTERNATIONAL SCIENTIFIC-

PRACTICAL CONFERENCE 'THE BIOTECHNOLOGY AND QUALITY OF THE LIFE': conference materials (Moscow, 18-20 March 2014). – Moscow, 2014. - p. 549-550.
4. Ustinova N.B. To the problem of understanding right choice of a profession by students of higher educational institutions / N.B. Ustinova // The scientific almanac. – 2016. - # 7-2 (21). – p. 256-258.

УДК 60:372.8; 60:658.310.8; 60:331.108

РОЛЬ УЧЕБНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ЛАБОРАТОРИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ У БАКАЛАВРОВ И МАГИСТРОВ ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ» В ФГБОУ ВО «САМГТУ»

В.В. Бахарев, З.Е. Мащенко

ФГБОУ ВО Самарский государственный технический университет
Самара, Россия 443100, г. Самара, ул. Куйбышева, 153
e-mail: fpp@samgtu.ru

При подготовке бакалавров и магистров по направлению «Биотехнология» в СамГТУ большое значение придается формированию практических навыков ра-боты. С этой целью на факультете пищевых производств создано несколько учебно-производственных лабораторий, в которых бакалавры и магистры полу-чают практические навыки работы максимально приближенные к условиям реального производства.

Ключевые слова: бакалавриат, магистратура, Биотехнология, практические навыки

На факультете пищевых производств ФГБОУ ВО «СамГТУ» ведется подготовка бакалавров по направлению 19.03.01 «Биотехнология» и магистров по направле-нию 19.04.01 «Биотехнология» (магистерская программа «Биотехнология функ-циональных продуктов питания и биологически активных веществ»).

Объектами профессиональной деятельности выпускников, освоивших программу бакалавриата и магистратуры по направлению «Биотехнология», являются: мик-роорганизмы, клеточные культуры животных и растений, вирусы, ферменты, био¬логически активные химические вещества; приборы и оборудование для исследо¬вания свойств используемых микроорганизмов, клеточных культур и получаемых с их помощью веществ в лабораторных и промышленных условиях; установки и оборудование для проведения биотехнологических процессов; средства контроля качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции; биомассы, установки и оборудование для проведения биотехнологических процессов; средства контроля качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции; регламенты на производ¬ство продуктов биотехнологии, международные стандарты [1, 2].

Особую роль в формировании практических навыков работы играет преемствен-ность дисциплин и всего процесса обучения на разных уровнях. Так, на выпус-кающей кафедре «Технология пищевых производств и парфюмерно-косметиче-ских продуктов» бакалавры с 1 по 2 курс по степени усложнения курса получают базовые навыки работы с биообъектами (работа с микроскопом; выделение чис-тых культур микроорганизмов; культивирование и идентификация микроорга-низмов; определение активности ферментов и ферментных препаратов и т.д.), а с 3 по 4 курс в рамках профессиональных дисциплин совершенствуют свои навыки (получение продуктов питания с использованием микроорганизмов, ферментных препаратов; микробиологический синтез органических растворителей, кислот и БАВ). Во время обучения в магистратуре обучающийся продолжает совершенствовать свои практические навыки и умения работы на более высоком уровне.

Для этого на факультете пищевых производств СамГТУ созданы следующие лаборатории: лаборатория технологии переработки продовольственного сырья; ла-боратория технологии бродильных процессов, включающая мини-пивоварню и винодельческую лабораторию; лаборатория биотехнологии переработки молока, включающая лабораторию сыроварения. В этих лабораториях бакалавры и маги-стры изучают биотехнологические процессы переработки продовольственного сырья, в частности использование микроорганизмов и ферментов в пивоварении, виноделии и производстве сыра.

В качестве завершающего этапа формирования практических навыков работы с биообъектами выступает научно-исследовательская выпускная квалификационная работа бакалавра и магистранта.

Таким образом, в процессе обучения созданы методологические подходы, помо-гающие процессу формирования практических навыков работы у будущих бака-лавров и магистров.

Литература:
1. Приказ Минобрнауки России от 11.03.2015 N 193 «Об утверждении федераль-ного государственного

образовательного стандарта высшего образования по на-правлению подготовки 19.03.01 Биотехнология (уровень бакалавриата)»
2. *Приказ Минобрнауки России от 21.11.2014 N 1495 «Об утверждении федераль-ного государственного образовательного стандарта высшего образования по на-правлению подготовки 19.04.01 Биотехнология (уровень магистратуры)»*

THE ROLE OF TRAINING AND PRODUCTION LABORATORIES IN THE FORMATION OF PRACTICAL SKILLS IN THE BACHELORS AND MASTERS ON DIRECTION «BIOTECHNOLOGY» IN SAMARA STATE TECHNICAL UNIVERSITY

Bakharev V. V., Mashchenko Z. E.

In the preparation of bachelors and masters on direction «Biotechnology» in Samara state technical University attaches great importance to the formation of practical skills. To this end, the food production Department established several training and production laboratories in which undergraduate and master's students get hands-on experience as close to real production.

Key words: undergraduate, graduate, Biotechnology, practical skills.

On the food production Department of Samara state technical University trains bachelors in the direction 19.03.01 "Biotechnology" and masters in 19.04.01 "Biotechnology" (master program "Biotechnology for functional foods and biologically active substances").

The objects of professional activity of the graduates who have completed the undergraduate program and graduate programs in the direction of "Biotechnology" are: microorganisms, cell cultures of animals and plants, viruses, enzymes, bio-logically active chemical substances; devices and equipment for investigation of properties of the used microorganisms, cell cultures and obtained with their help substances in laboratory and industrial applications; installation and equipment for carrying out biotechnological processes; control quality of raw materials, semi-finished and finished products; biomass, plant and equipment for biotechnological processes; control quality of raw materials, semi-finished and finished products; regulations on the production of biotechnology products, international standards [1, 2].

A special role in the formation of practical skills plays a succession of disciplines and the learning process at different levels. So, in the morning caused the Department "Technology of food production and perfume-cosmetic products" bachelors with 1 to 2 year according to the degree of complexity of the course receive the basic skills of working with biological objects (work with microscope; selection of pure cultures of microorganisms; cultivation and identification microorganisms; determination of the activity of enzymes and enzyme preparations, etc.), and 3 - 4 course within the professional disciplines improve their skills (obtaining food using microorganisms, enzyme preparations; microbiological synthesis of organic dissolve-lay, acids and BAS). During the graduate student continues to improve their practical skills and work skills at a higher level.

On the food production Department of Samara state technical University established the following laboratories: laboratory of processing technology of food raw materials; laboratory of technology of fermentative processes, including a mini-brewery and winery laboratory; biotechnology laboratory of milk processing, including cheese making lab. In these laboratories the bachelors and masters study biotechnological processes of processing of food raw materials, in particular the use of microorganisms and enzymes in brewing, winemaking and cheese production.

As the final stage of formation of practical skills of work with biological objects performs research final qualifying work of bachelor and master student.

Thus, in the process of learning established methodological approaches that help the process of formation of practical skills of future bachelors and masters.

References:

1. *The order of the Ministry of education and science 11.03.2015 N 193 "About the statement of Federal state educational standard of higher education in the direction of training 19.03.01 Biotechnology (undergraduate level)".*
2. *The order of the Ministry of education and science 21.11.2014 N 1495 "About the statement of Federal state educational standard of higher education in the direction of training 19.04.01 Biotechnology (graduate level)".*

УДК 378.014.24:606:664

РОЛЬ МЕЖДУНАРОДНЫХ ПРОЕКТОВ В РАЗВИТИИ ОБРАЗОВАНИЯ ПО БИОЭКОНОМИКЕ В РОССИИ

Стаурская Н.В.[1], Вебер А.Л.[2], Казыдуб Н.Г.[2],

[1]Омский государственный технический университет, Омск, Россия, 644050, Омск, пр-кт Мира, 11
e-mail: nat_staur@mail.ru
[2]Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Омск, Россия
644008, Омск, Институтская пл., 2

Переосмысление образовательной политики в мировом масштабе, произошедшие на фоне реформ высшего образования согласно требований Болонского Процесса и намечающейся смены технологического уклада, повлекло за собой возникновение новых конкурентоспособных образовательных программ, отвечающих ряду требований. К таким требованиям можно отнести востребованность на рынке труда, междисциплинарность. Подготовка специалистов на стыке специальностей обеспечивает рынок труда, как в отдельных традиционных отраслях, так и в новых, спрос на которые находится на этапе формирования.
Ключевые слова: биотехнология, биоэкономика, болонский процесс, менеджмент, конкурентоспособные образовательные программы.

На международном уровне велась работа по разработке нового, единого подхода к формированию компетенций обучающихся [Олейникова 2014, с. 192]. Важным шагом в данном направлении стала реализация ряд проектов Tempus IV (с 2014 г. – Erasmus Plus Kea Action 2 – Capacity Building in Higher Education), направленных на разработку и апробацию рамки квалификации. Значительная часть таких проектов так или иначе была фрагментарно или косвенно связана с биоэкономикой за счет междисциплинарной природы данного образовательного направления. Особо необходимо выделить проект, реализованный в рамках, сначала, Tempus IV, а затем Erasmus Plus Key Action 2 Capacity Building in Higher Education. Первый проект Tempus IV "Vocational Training in Rural Development and Ecology" (RUDECO) был направлен на повышение квалификации представителей государственных структур и бизнеса, осуществляющих свою деятельность в сфере сельского хозяйства, экологии, продовольствия и смежных направлений.

В 2015 г. началась работа по реализации проекта Erasmus Plus Key Action 2 Capacity Building in Higher Education "Sustainable Agriculture and Rural Development" (SARUD). Данный проект стал логическим продолжением первого, значительно расширил свою территорию за счет привлечения партнеров из Казахстана. В рамках проекта запланирована разработка и внедрение международной магистерской программы по устойчивому развитию территорий. С точки зрения качественной оценки, оба проекта в целом носят синергетический характер.

Проект SARUD интересен особенностями, одна из которых состоит в том, что биоэкономике отводится место точки преломления взглядов на устойчивое развитие территорий, разработку новых подходов к устойчивости аграрного производства: эффективное использование отходов, развитие биоэнергетики, повышение устойчивости сельского хозяйства, производство новых биоматериалов и химических веществ, а так же экологизацию промышленности. Кроме того, проект поэтапно экстраполирует методологический опыт образования различного уровня в сфере устойчивого развития территорий на территории сопредельных государств.

Можно сделать вывод, что в рамках вышеперечисленных проектов была проведена значительная работа по созданию предпосылок к началу научно-исследовательской и образовательной деятельности в сфере биоэкономики. Необходимо отметить широкий территориальный охват проектной деятельности: в реализации проектов приняли участие вузы 20 городов России. Обширная география проектов позволила повысить интерес к изучению, как методологического вопроса адаптации рамки квалификации, так и широкого круга естественнонаучных дисциплин, замыкающихся на биоэкономике. Так проекты вышли за рамки режима апробации в режим дальнейшего развития и генерации новых научно-образовательных направлений.

Литература:

1. Олейникова О.Н. Вклад программы Темпус в процессы интернационализации высшего образования. Вестник МГОУ. Серия: Педагогика.2014, №4. – С. 191-198.

UDC 378.014.24:606:664

ROLE OF INTERNATIONAL PROJECTS FOR DEVELOPMENT OF BIO-BASED ECONOMY STUDIES IN RUSSIA

Staurskaya N.V.[1], Veber A.L.[2], Kazydub N.G.[2]

[1]Omsk State Technical University, Omsk, Russia, 644050, Omsk, Mira Av., 11
e-mail: nat_staur@mail.ru
[2]Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia
644008, Omsk, Institutskaya sq., 2

Reconsideration of the policy in the field of higher education in the global dimension according to the requirements of the Bologna Process and emerging shift of the technological mode resulted in development of new study programs that meet a number of up-to-date requirements. These requirements include demand at the labor market and interdisciplinary nature of the programs. Training of specialists at the edge of different subject areas supplies both conventional and new business sectors.

Key words: biotechnology, bio-based economy, Bologna Process, management, competitive study programs.

Colleagues from different countries have joined forces to elaborate a new united approach to development of students' competences [Oleynikova 2014, p. 192]. Implementation of a number of international projects Tempus IV (since 2014 – Erasmus Plus Kea Action 2 – Capacity Building in Higher Education) for development and testing of qualification frameworks have played its important role. Many of these projects were directly or indirectly related to bio-based economy due to the cross-subject nature of this educational area.

It seems crucial to pay attention to the project implemented firstly within the framework of EU program Tempus IV and its follow-up under Erasmus Plus Key Action 2 Capacity Building in Higher Education. The first project titled Tempus IV "Vocational Training in Rural Development and Ecology" (RUDECO) aimed at vocational training of governmental authorities and private sector in the field of agriculture, ecology, food and other relate areas.

In 2015 was launched the project Erasmus Plus Key Action 2 Capacity Building in Higher Education "Sustainable Agriculture and Rural Development" (SARUD). This project turned out a logical follow-up of the first one but is remarkable was its extended partnership area due to involvement of partners from Kazakhstan. The project aims at elaboration and implementation if international master study program in sustainable territorial development. From the point of quality assessment both projects gain synergy effect. SARUD project draws attention as a hub of bio-based economy as a cross view-point on sustainable territorial development, new approaches to sustainability of agricultural production: efficient waste management, development of bio-energy, improvement of suitability of agriculture, production of new bio-based materials and chemicals and environmentalization of industry. Besides, the project coherently disseminates the experience in training specialists in sustainable development to neighboring countries.

It can be concluded that these projects have created conditions for launching research and study programs in bio-based economy. It is necessary to mention the vast geographical coverage of the projects as they brought together universities from 20 Russian cities. This factor enhanced interest to qualification framework studies including its aspects related to life sciences and bio-based economy in particular. That is how the projects have overcome the barriers of testing mode for further development and generating new research and educational goals.

References:

1. *Oleynikova O.N. Impact of the Tempus program on internationalization of higher education. Journal of Moscow State Regional University. Series: Pedagogy. 2014, №4. – P. 191-198.*

ЭКОЛОГООРИЕНТИРОВАННОЕ ПРАВОСОЗНАНИЕ КАК ОДНА ИЗ КЛЮЧЕВЫХ ЗАДАЧ ЮРИДИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В ЦЕЛЯХ СОДЕЙСТВИЯ СОХРАНЕНИЮ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

Рыбалко А.Е., Оганесян А. К.

Сочинский институт (филиал) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», 354348, Сочи, ул. Куйбышева, 32.

Как известно, 2017й год объявлен в России Годом экологии. На заседании Госсовета, состоявшемся 27 декабря 2016 года, Президент России В.В. Путин отметил: «Наша страна располагает колоссальными запасами пресной воды, лесных ресурсов, огромным биоразнообразием, и выступает как экологический донор мира, обеспечивая ему почти 10% биосферной устойчивости. Еще в начале XX века Владимир Иванович Вернадский предупреждал, что наступит время, когда людям придется взять на себя ответственность за развитие и человека, и природы. И такое время, безусловно, наступило. Человечество уже накопило огромное количество экологических долгов, и продолжает испытывать природу на прочность».

Таким образом, задача сохранения экологии, экологического биоразнообразия актуализирована до предела.

Ошибочно полагать, что данная задача должна ложиться на плечи лишь биологов и экологов. На наш взгляд, студенты высшей школы, будущие специалисты в различных отраслях народного хозяйства, независимо от получаемой профессии, в рамках прививаемых компетенций должны получать необходимый объем знаний, умений, навыков, которые позволят в дальнейшем, в рамках решения профессиональных задач, содействовать, в том числе, и сохранению существующего биоразнообразия.

Студенты юридических факультетов не составляют здесь исключения. Тем более в ситуации, когда под занавес 2016 года приказом Министерства образования и науки Российской Федерации от 01.12.2016 № 1511 утвержден федеральный государственный образовательный стандарт высшего образования по направлению подготовки 40.03.01.

Предполагалось, что стандарт будет продолжением линейки стандартов поколения 3+, однако даже беглый взгляд на него опровергает подобные суждения: перед нами полноценный стандарт четвертого поколения.

Основные отличия от массы стандартов 3+: отход от немедленного вступления стандарта в силу. В стандарте 4 поколения прописана дата вступления в силу – 1 сентября 2017 года; отход от стандартной 3+ схемы структуры итоговой государственной аттестации: обязательная защита ВКР, а госэкзамен – по желанию организации. В стандарте 4 поколения – наоборот; Четко прописаны обязательные дисциплины базовой части.

Основные (значимые) отличия от стандарта 3 поколения: появление общепрофессиональных компетенций; из видов профессиональной деятельности исключена педагогическая деятельность; вместо циклов – три модуля: Дисциплины (Базовая часть, вариативная часть), Практики, ИГА; на заочное отделение можно поступать лишь при наличии первого высшего образования; Вместо двух госэкзаменов установлен один; появилось требование об активном использовании электронной образовательной среды, средств фиксации результатов обучения студента (так называемые учебные порталы и т.д.) и ряд других.

Анализируя предусмотренные компетенции, отметим общепрофессиональную компетенцию «способность работать на благо общества и государства (ОПК-2)» и профессиональные компетенции «способность осуществлять профессиональную деятельность на основе развитого правосознания, правового мышления и правовой культуры (ПК-2), «готовность к выполнению должностных обязанностей по обеспечению законности и правопорядка, безопасности личности, общества и государства (ПК-8). На наш взгляд, в ходе формирования этих (да и ряда других) компетенций, в рамках образовательного процесса, студенты должны в достаточной мере изучить действующее законодательство, стоящее на страже интересов экологии и сохранения биоразнообразия (Федеральный закон от 14.03.1995 N 33-ФЗ "Об особо охраняемых природных территориях", Федеральный закон от 10.01.2002 N 7-ФЗ "Об охране окружающей среды", Федеральный закон от 23.11.1995 N 174-ФЗ "Об экологической экспертизе" и др.), выработать соответствующее правосознание и правовое мышление, получить навыки, которые позволят обеспечить безопасность личности, общества и государства, заключающееся, не в последнюю очередь, в состоянии и сохранении биоразнообразия.

Таким образом, формирование правильного, экологоориентированного правосознания у граждан России – задача, стоящая перед многими институтами российского общества, и сфера юридического образования здесь – не исключение.

ECO-ORIENTED LEGAL AWARENESS AS ONE OF KEY TASKS OF LEGAL EDUCATION IN ORDER TO PROMOTE WITH BIODIVERSITY PRESERVATION

Rybalko A.E., Oganesyan A.K.

Sochi branch of Peoples' friendship University of Russia, 354348, Sochi, Kuibysheva str., 32.

2017 is An Ecology Year in Russia. President Putin stated during State Council meeting on December, 27: «Our country has a huge fresh water funds, forest resources, great biodiversity. It is like an ecological donor of the world,

providing about 10% of its biospheric sustainability. In the early XX century Vernadsky warned it would be time when people have to take responsibility for development of both – mankind and nature. And this time, of course, come. Mankind has already accumulated a huge ecological debt and has been testing the strength of nature».

Therefore, the task of the ecology and biodiversity preservation is strictly actualized.

It is a mistake to think that this task is only for biologists and ecologists. In our opinion, high school undergraduates, who are future professionals in different fields of national economy, regardless of faculty, within imparted competencies should obtain required volume of knowledge and skills in order to promote with biodiversity preservation while solving professional tasks.

Legal faculties' undergraduates are not exception. Especially because new educational standard for Bachelors of jurisprudence was adopted on December, 29 (The Ministry of Education and Science of the Russian Federation Act from 29.12.2016 № 1511)

It was supposed the standard will be three-plus one, but even a quick look at him tells us – it's a full fourth generation standard.

The main differences from three-plus standards are: no immediate entry into force – exact date (01.09.2017) instead of it; mandatory state exam and optional final qualifying work unlike three-plus standards' scheme (mandatory final qualifying work and optional state exam); exact list of basic subjects.

The main differences from third generation standards are: appearance of new type of competencies; no teaching activities for graduates; three modules (Subjects, Practices, Final State Certification) instead of cycles; no extramural legal education without any previous high education; one state exam instead of two; the requirement for active use of e-learning environment.

Analyzing provided competencies we should note competences: OPK-2 – «ability to work for the benefit of society and the state», PK-2 – «ability to carry out professional activities on a base of developed legal awareness, legal thinking and legal culture», PK-8 – «readiness to perform duties of maintenance of law and order, the security of individuals, society and the state». In our opinion, while forming these and other competencies within educational process, undergraduates must learn current legislation providing protection of environment and biodiversity preservation (Federal law N 33-FZ «On Specially Protected Natural Territories», Federal law N 7-FZ «On Environmental Protection», Federal law N 174-FZ «On Environmental Impact Assessment» etc.), work out proper legal awareness and legal thinking, obtain skills, which let them to provide security of individuals, society and the state. The security includes state and preservation of biodiversity.

Therefore, formation of proper, eco-oriented legal awareness of Russian citizens is a task for many institutions of our society, and there is no exception for the sphere of legal education.

УДК 378; 631; 006

О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ КОМПЕТЕНТНОСНОГО ПОДХОДА В ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ ПО НАПРАВЛЕНИЯМ ПОДГОТОВКИ БАКАЛАВРИАТА 19.03.01 «БИОТЕХНОЛОГИЯ» И 35.03.07 «ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА И ПЕРЕРАБОТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ»

Пахомова В.М., Даминова А.И.

ФГБОУ ВО « Казанский государственный аграрный университет», Казань, Россия
Казань, ул. К. Маркса, 420015
e-mail: pahomovav@mail.ru

Предлагаются базовые дисциплины учебных планов и новая профессиональная компетенция ФГОС 4 по направлениям подготовки высшего образования 19.03.01 «Биотехнология» и 35.03.07 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции».

Ключевые слова: направление подготовки, высшее образование, базовые дисциплины, учебный план, компетенции, ФГОС

С целью интенсификации развития биотехнологий по переработке сельскохозяйственной продукции и сетевой формы обучения между классическими университетами, технологическими и аграрными ВУЗами

Российской Федерации предлагается следующий комплекс мер:

1) Федеральным УМО по промышленной экологии и биотехнологии (укрупненной группе специальностей УГС 190000) необходимо рекомендовать включать в базовую часть учебных планов бакалавров по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология» дисциплину «Биотехнология переработки сельскохозяйственной продукции»;

2) Федеральному УМО по сельскому, лесному и рыбному хозяйству (укрупненной группе специальностей УГС 350000) необходимо рекомендовать включать в базовую часть учебных планов бакалавров по направлению подготовки 35.03.07 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» дисциплину «Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции»;

3) Министерству образования и науки РФ необходимо ввести во ФГОС 4 бакалавриата по направлению подготовки 35.03.07 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» профессиональную компетенцию ПК 24 – готовность применять (использовать) биотехнологии, в том числе импортозамещающие, при производстве и переработке сельскохозяйственной продукции (для прикладного и академического бакалавриата) и (или) способностью к их разработке (для академического бакалавриата).

.....

UDC 378; 631; 006

ON IMPROVEMENT COMPETENCE APPROACH IN EDUCATIONAL TECHNOLOGIES IN AREAS OF UNDERGRADUATE GROUNDING IN 03.19.01 «BIOTECHNOLOGY» AND IN 35.03.07 «TECHNOLOGY OF PRODUCTION AND TREATMENT OF AGRICULTURAL PRODUCE»

Pakhomova V.M., Daminova A.I.

Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia
Kazan, st. Marx, 420015
e-mail: pahomovav@mail.ru

Basic disciplines of curricula and new professional competence of GEF-4 in areas of training of higher education 03.19.01 «Biotechnology» and 35.03.07 «Technology of production and treatment of agricultural produce» have been proposed.

Key words: direction of training, higher education, basic disciplines, curriculum, competence, federal state standard FSS.

In order to intensify the development of biotechnology for the treatment of agricultural produce and a network system of study between the classical universities, technological and agricultural universities of the Russian Federation have been proposed the following set of efforts:

1) Federal educational and methodical Association on Industrial Ecology and Biotechnology (enlarged group of specialties 190000 EGS) is recommended to include into the curriculum of bachelor in 03.19.01 «Biotechnology» the discipline «Biotechnology of treatment of agricultural produce» as the basic discipline;

2) Federal educational and methodical Association on Agriculture, Forestry and Fisheries (enlarged group of specialties 350000 EGS) is recommended to include into the curriculum of bachelor in 35.03.07 «Technology of production and treatment of agricultural produce» the discipline «The basis of biotechnology treatment of agricultural produce» as the basic discipline;

3) The Ministry of Education and Science of the Russian Federation is recommended to include into the FSS (Federal state standard) of 4 variation in the undergraduate grounding of bachelor in 35.03.07 «Technology of production and treatment of agricultural produce» the professional competence PC 24 - willingness to use (use) of biotechnologies, including import substitution biotechnologies, in the production and treatment of agricultural produce (for applied and academic undergraduate) and (or) the ability for their development (for academic undergraduate).

УДК 637.514.92

МОДЕРНИЗАЦИЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ УГСН 19.00.00 ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ АССОЦИАЦИЙ РАБОТОДАТЕЛЕЙ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В ДВ РЕГИОНЕ

Каленик Т.К. [1], Ищенко С.А. [2], Михеева Н.А.[2], Мезенова О.Я. [3], Фаткулин А.А. [1], Косенко Т.А. [1]

[1] ФГАОУ ВО «Дальневосточный Федеральный Университет» Школа биомедицины, Владивосток, Россия.
[2] ППО «Никольскъ», Уссурийск, Россия.
[3] ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», кафедра пищевой биотехнологии, Калининград, Россия.
e-mail: kalenik.tk@dvfu.ru

В настоящее время модернизация образовательных программ является ключевой задачей высшего образования. Модернизация образовательных программ идет в соответствии с потребностями рынка труда и работодателей.

Ключевые слова: модернизация образовательных программ, высшее образование, биотехнология, магистратура.

Одной из главных задач высшего образования является модернизация высшего образования, реформирование и внедрение научной составляющей учебного процесса для формирования высококвалифицированного специалиста, необходимого работодателю, успешно освоившего общекультурные, общепрофессиональные и профессиональные компетенции в соответствии с требованиями стандарта [1]. Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета реализует подготовку студентов по укрупнённой группе специальностей 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнология». Качество образования, улучшается за счет реализации образовательных технологий к реально действующим производствам в пищевой промышленности.

Модернизация образовательных программ идет в соответствии с современными требованиями рынка труда и работодателей. Совместно с Ассоциацией предприятий пищевой и перерабатывающей промышленности «Никольск» Дальневосточного региона был разработан образовательный стандарт нового поколения по направлению подготовки 19.04.05 Высокотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения, в котором были учтены требования работодателей к качеству образования.

Литература:

1. Болгова М.А., Ветрова Е.А., Имидж, бренд и позиционирование образовательной организации высшего образования в условиях модернизации системы высшего образования // Вестник Тамбовского университета. Серия: Гуманитарные науки. 2015. № 7 (147). С. 89-93.

UDC 637.514.92

MODERNIZATION OF EDUCATIONAL PROGRAMS UGSN 19.00.00 INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY IN ACCORDANCE WITH THE REQUIREMENTS OF EMPLOYERS ASSOCIATION OF FOOD INDUSTRY IN THE REGION ET

Kalenik T.K. [1], Ishchenko, S.A. [2], Mikheyeva N.A.[2], Mezenova O.J.[3], Fatkulin A.A. [1], Kosenko T.A. [1]

1FGAOU VO Far Eastern Federal University, School of Biomedicine, Vladivostok, Russia.
2 PPO «Nikolsk», Ussuriysk, Russia.
3FGBOU VO Kaliningrad State Technical University, Department of Food Biotechnology, Kaliningrad, Russia.
e-mail: kalenik.tk@dvfu.ru

Currently, the modernization of the educational programs is a key task of higher education. Modernization of educational programs is in accordance with the needs of the labor market and employers.

Key words: modernization of educational programs, higher education, biotechnology, magistracy.

One of the main tasks of higher education is the modernization of higher education reform and implementation of the scientific component of the educational process for the formation of a highly qualified specialist, required an employer, have successfully mastered the general cultural, professional and general professional competence in accordance with the requirements of the standard [1]. School School of biomedicine Far Eastern Federal University implements training students in bigger group of specialties 19.00.00 «Industrial ecology and biotechnology.» The quality of education is improved through the implementation of educational technologies to the actual current production in the food industry. Modernization of educational programs is in accordance with modern requirements of the labor market and employers. Together with the Association of enterprises of food and processing industry «Nikolskoye» Far East region has been developed a new generation of educational standards in the direction of preparation 19.04.05 High-tech production of functional foods and special purposes, which took into account requirements of employers to the quality of education.

References:

1. *Bolgova M.A., Vetrova E.A. Imidzh brend i pozitcionirovanie obrazovatelnoi organizatcii vysshego obrazovaniia v usloviiakh modernizatcii sistemy vysshego obrazovaniia Vestnik Tambovskogo universiteta Seriia Gumanitarnye nauki. 2015. № 7 (147). S. 89-93.*

2017 BIO TECH WORLD

WWW.BIOMOS.RU

ОРГАНИЗАТОР / ORGANIZER

RED GROUP

РЭД ГРУПП
RED GROUP

ПРИ УЧАСТИИ / SUPPORTED BY

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО)
Federal Agency for Research Organizations (FANO of Russia)

МИНПРОМТОРГ РОССИИ
Министерство промышленности и торговли Российской Федерации
Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation

Министерство экономического развития Российской Федерации
Ministry of Economic Development of the Russian Federation

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Ministry of Agriculture of the Russian Federation

Российская академия наук
Russian Academy of Sciences

Департамент науки, промышленной политики и предпринимательства Москвы
Moscow City Department of Science, Industrial Policy and Entrepreneurship

Департамент природопользования и охраны окружающей среды Москвы
Moscow City Department of Nature and Environmental Protection

Российский союз химиков
Russian Chemists' Union

Primer Capital
Венчурный фонд Primer Capital
Venture Fund Primer Capital

Совет молодых ученых РАН
Council of Young Scientist of Russian Academy of Science

Министерство инвестиций и инноваций Московской области
Ministry of investment and innovations of Moscow Region

РФФИ
Российский фонд фундаментальных исследований
Russia Foundation for Basic Research

ELSEVIER

FUTURE BIOTECH

Биомолекула
Biomolekula

Бластим
Работа в биотехе
Blastim

+7 (495) 780-41-09 | e-mail: info@biomos.ru | www.biomos.ru