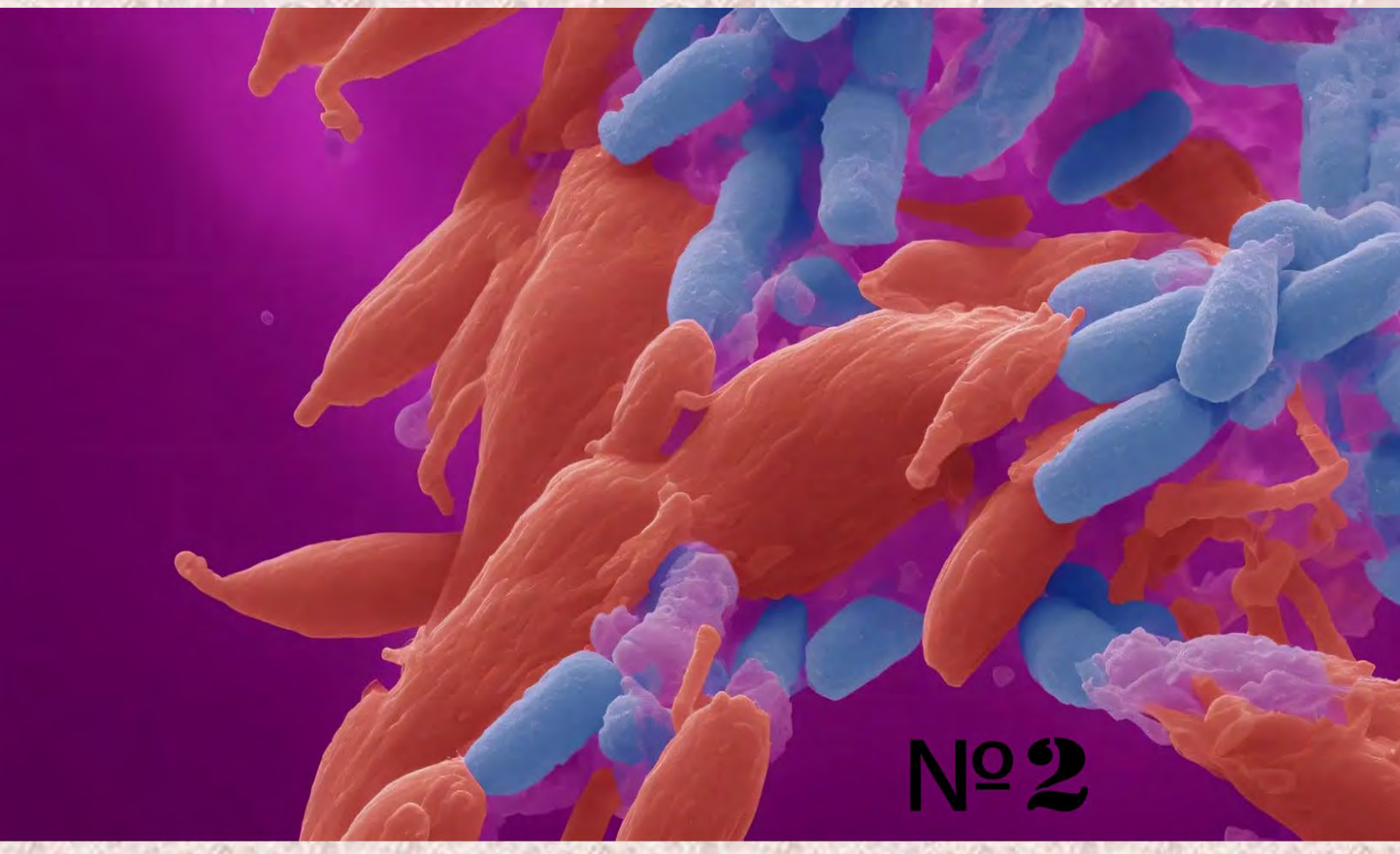
16+

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология



№2

2023

ISSN 2304-4691

Основан в 2012г.
г. Воронеж

Актуальная биотехнология

№ 2

2023

16+

Учредитель: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Главный редактор
д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет
д.б.н., профессор Ф.К. Алимова
д.т.н., профессор В.В. Бирюков
д.т.н., профессор Л.А. Иванова
д.б.н., профессор Л.П. Лазурина
д.б.н., профессор Е.Г. Новосёлова
д.х.н., профессор Т.В. Овчинникова
д.т.н., профессор А.Н. Остриков
д.т.н., Член-Корр. РАСХН Л.В. Римарева

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год

Официальный сайт «Актуальная биотехнология» www.actbio-vsuet.ru
Подписной индекс издания в агентстве "Роспечать" 58012

Ответственный секретарь: ДЕРКАНОСОВА А.А. (эл. почта: post@actbio-vsuet.ru)

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-62393 от 14 июля 2015 г.

Адрес университета, редакции, издательства и отдела полиграфии ФГБОУ ВО «ВГУИТ»
394036, Воронеж, пр. Революции д.19 ауд.11
тел./факс: (473) 255-37-16
E-mail: post@actbio-vsuet.ru

Сдано в набор 04.10.2023. Подписано в печать 10.10.2023
Выход в свет: 15.10.2023
Формат 70×100 1/8.
Усл. печ. л. 14,5 Тираж 1500 экз. Заказ.
Цена – свободная.

© ФГБОУ ВО «Воронеж. гос. ун-т инж. технол.», 2023

.

Содержание

МАТЕРИАЛЫ XI МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ: НАУКА И ПРАКТИКА»

НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОГО ОБНОВЛЕНИЯ ХРОМАФФИННОЙ ТКАНИ
Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, В.В. Яглов 6

ИЗМЕНЕНИЯ ИНВОЛЮТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТИМУСЕ ЭНДОКРИННЫМИ ДИСРАПТОРАМИ
С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, Э.С. Цомартова, С.В. Назимова, В.В. Яглов 10

ИССЛЕДОВАНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ФЛАГЕЛЛИНА-С PSEUDOMONAS AERUGINOSA
А.П. Жеребцов, А.А. Калошин, Н.А. Михайлова 14

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕСКЛЕТОЧНЫХ КОКЛЮШНЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОПЛЕНОЧНОЙ И ПЛАНКТОННОЙ КУЛЬТУР BORDETELLA PERTUSSIS
Е.М. Зайцев, М.В. Брицина, М.Н. Озерецковская, А.Е. Зайцев 15

БАКТЕРИИ BACILLUS SUBTILIS – ПРОДУЦЕНТЫ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ
С.А. Лазарев, Е.О. Калиниченко, С.А. Сходова, Н.А. Михайлова 19

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И СВОЙСТВА УЛЬТРАТОНКИХ ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА
А.А. Ольхов[1,2], Ю.Н. Зернова[2], В.С. Маркин[2], Р.Ю. Косенко[2], А.Л. Иорданский[2] 21

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛОВ
И.А. Буторова[1], Л.С. Донская[1], Д.А. Матвеева[1], Е.С. Олейник[2], К.И. Киенская[1] 26

НЕ-АНТИБИОТИКИ НА ОСНОВЕ РИБАВИРИНА ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
К.И. Киенская, Донская Л.С., Матвеева Д.А., Бобровницкий С.К., И.А. Буторова 27

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ВЫБОРУ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI K-12 И B ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ В ПРОМЫШЛЕННЫХ МАСШТАБАХ
Н.С. Плеханова[1], И.Н. Соловьева[1], А.В. Липкин[2] 28

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОЗОЛЯ ГИДРОКСИДА ГАДОЛИНИЯ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ, ОСНОВАННЫМ НА СОДЕРЖАНИИ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА В СРЕДЕ
В.С. Макулова, Л.О. Шадская, И.А. Буторова, И.А. Белова, А.С. Гродский 29

К ВОПРОСУ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ФАЛЬСИФИКАЦИИ КОЗЬЕГО МОЛОКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
А.В. Хан, О.Ю. Фоменко 32

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА В ДРОЖЖАХ SACCHAROMYCES BOULARDII
Е.А. Белаш, Д.Н. Щербаков, Е.А. Колосова, Д.В. Балабова 33

ФОРМИРОВАНИЕ ПОРИСТЫХ БИОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ: ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И АЛЬГИНАТА НАТРИЯ С АНТИОКСИДАНТАМИ В УСЛОВИЯХ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ДИСПЕРГИРОВАНИЯ И МИКРОВОЛНОВОГО НАГРЕВА
М.А. Яковлева[1], В.Н. Горшенев[1], А.Е. Донцов[1], Н.Л. Аронштам, Е.Л. Кучеренко[2], А.А. Ольхов[1,3] 35

ВЛИЯНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ В ОСТЕОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
Н.А. Надеждина, Ю.И. Тарануха, М.В. Покровский, С.В. Надеждин 39

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ANABAENA SPHAERICA BORN. ET FLAH. IPPAS B-404
М.С. Темнов, Я.В. Устинская, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий 41

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ ЧЕЛОВЕКА
С.А. Лапа, С.А. Суржиков, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов 46

МАГНИТНЫЕ НАНОБИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ
А.М. Сульман, Д.В. Балакшина, О.В. Гребенникова, В.Г. Матвеева 48

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ
Д.К. Армянинова, А.В. Гончаренко 50

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ЛИПИД – ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ LC-LTP2 ДЛЯ ПОИСКА КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В СВЯЗЫВАНИИ ЛИГАНДОВ
А.Е. Потапов, И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова, Д.Н. Мельникова **51**

ДЕСТРУКТОРЫ НЕФТИ: КОМПЬЮТЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ И СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ
М.С. Кондратьев[1], А.А. Бадалов[1], Н.Н. Хечинашвили[1], В.М. Комаров[1], А.А. Самченко[1], И.Ф. Пунтус[2] **52**

К ВОПРОСУ О БИОЛОГИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ ПАТОВАРОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ В УСЛОВИЯХ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ
М.А. Кузнецов[1], А.А. Щербаков[1], О.С. Ларионова[1], Е.А. Горельникова[2], Н.С. Червякова[2] **53**

ЭЛЕКТРОАКТИВНЫЕ ПОЛИМЕР-ОСНОВАННЫЕ КОМПОЗИТЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОМАТЕРИАЛА В БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ
С.В. Алферов, В.В. Федина **56**

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-6-9

УДК 611.452

НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОГО ОБНОВЛЕНИЯ ХРОМАФФИННОЙ ТКАНИ

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», г. Москва, Россия

Введение

Хромаффинная ткань в организме представлена хромаффинными клетками мозгового вещества надпочечников и параганглиями, вырабатывающими катехоламины, энкефалины и энкефалин-содержащие пептиды [1]. Ее роль в реализации защитных реакций на стресс уникальна и имеет сложные механизмы. Хромаффинные клетки надпочечников являются не только оригинальным "преобразователем стресса" в организме, но и регуляторным узлом для секреции пептидов, важных для стресса и воспаления, а также для интеграции стрессового ответа с нервной системой [2]. Защитные реакции требуют активного участия и мозгового и коркового вещества надпочечников, и их дисфункция может иметь необратимые последствия для организма. Однако способность к регенерации у этих двух структур различна. Известно, что у коркового вещества она значительно выше, чем у мозгового [3]. Механизмы репаративной регенерации и самообновления хромаффинных клеток мало изучены, что является серьезным препятствием для развития новых более эффективных способов лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как клеточная терапия.

Цель работы – выявление факторов и механизмов, обеспечивающих самообновление хромаффинных клеток мозговом веществе надпочечников.

Материалы и методы

Объектом исследования были самцы крыс Вистар (n=20). Животных выводили из эксперимента в пубертатном периоде (6 недель), когда надпочечник активно развивается и в постпубертатном периоде в возрасте 10 недель, когда рост надпочечника крысы завершается [4,5]. Эксперимент проведён в соответствии с ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и ухо у за лабораторными животными, Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.), а также Приказом МЗ РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов органа, окрашенных гематоксилином и эозином. Морфометрию светооптических препаратов проводили с помощью программы “Image Scope” (“Leica Microsystems”, Германия). Определяли площадь мозгового вещества и площадь, занимаемую хромаффинными клетками в мозговом веществе.

Для определения степени дифференцировки хромаффинных клеток использовали иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы с помощью поликлональных кроличьих антител (“Abcam”, Великобритания). Пролиферативную активность хромаффинных клеток исследовали с помощью антител к Ki-67, экспрессию лиганда Shh, транскрипционных факторов POU5F1 и Sox2 в хромаффинных клетках выявляли также иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных антител (“Abcam”, Великобритания). Подсчитывали процент позитивных клеток. Производили иммуногистохимическое исследование β-катенина, являющегося активатором канонического Wnt-сигналинга, с определением процента позитивных клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализациями белка.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения (M±m). Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и $\chi 2$. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты

У крыс в периоде полового созревания мозговое вещество надпочечников имело типичное строение и было образовано скоплениями хромаффинных клеток, разделенных венозными синусоидами. Хромаффинные клетки занимали около 75 % площади мозгового вещества. Скопления хромаффинных клеток были разделены прослойками соединительной ткани.

100 % хромаффинных клеток характеризовались высокой экспрессией тирозингидроксилазы, что свидетельствует об их терминальной дифференцировке. Процент пролиферирующих хромаффиноцитов был небольшим. Экспрессия β-катенина в хромаффинных была низкой. Чаще встречались клетки с мембранной локализацией β-катенина. Среди хромаффинных клеток выявлялись единичные POU5F1-позитивные клетки, а транскрипционный фактор Sox2 не в хромаффинных клетках не обнаруживался. Встречались единичные клетки с ядерной локализацией сигнальной молекулы Shh.

После завершения роста надпочечников к 10-й неделе у крыс размеры органа статистически значимо увеличились по сравнению с периодом полового созревания. Площадь мозгового вещества также увеличилась. Соотношение площади хромаффинных клеток и стромы не изменялось (рис. 1).

У всех хромаффинных клетках обнаруживалось высокое содержание фермента тирозингидроксилазы в цитоплазме аналогичное пубертатному периоду (рис 2). В среднем количество делящихся хромаффинных клеток составляло 1,5–1,7 %, что было значительно меньше, чем в периоде полового созревания и (рис. 2).

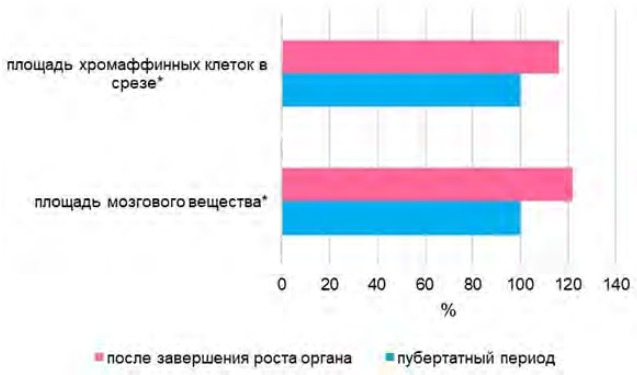


Рис. 1 – Возрастные изменения размеров мозгового вещества надпочечников крыс

Рис. 2 – Возрастные изменения экспрессии транскрипционного фактора POU5F1, активации Wnt-сигналинга, Ki-67, лиганда Shh и тирозингидроксилазы в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников крыс

Примечания: значения пубертатного возраста приняты за 100 %. * – статистически значимые отличия от значений пубертатного периода

Относительное содержание β-катенин-позитивных хромаффинных клеток с локализацией в плазмолемме уменьшилось в два раза, вследствие чего общее количество β-катенин-позитивных клеток не изменилось по сравнению с пубертатным периодом. Но процент хромаффинных клеток с локализацией β-катенина, свидетельствующей об активации Wnt-сигналинга, в ядре увеличился почти в три раза (рис. 2).

К моменту завершения роста надпочечников количество POU5F1-позитивных клеток увеличилось, при этом степень увеличения численности была идентичной увеличению показателя активации Wnt-сигналинга. Количество хромаффинных клеток, экспрессирующих лиганд Shh, значительно возросло. Процент Shh-позитивных клеток соответствовал показателю POU5F1. Sox2 по-прежнему не выявлялся.

Обсуждение

В настоящем эксперименте мы установили, что пролиферативная активность хромаффинных клеток снижается по мере роста надпочечников до критически низких значений. Следовательно, должен существовать иной механизм индукции клеточного деления. Wnt-сигналинг влияет на многие аспекты развития и функции нервной системы. Белки Wnt активируют множество сигнальных путей и индуцируют разнообразные клеточные процессы, включая пролиферацию и дифференцировку клеток, изменения транскрипции генов и др. [6]. Нами продемонстрировано, что число клеток с транслокацией β-катенина в ядро после завершения роста органа увеличивается, то есть, после остановки роста происходит усиление активации канонического Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках, что можно рассматривать как дополнительный механизм физиологической регенерации.

Сигнальный путь Shh играет важную роль в развитии нервной системы [7]. Shh, связываясь со своим рецептором Patched, подавляет связанный с G-белком рецептор Smoothened, что приводит к активации гомолога-1 онкогена, ассоциированного с глиомой (Gli-1). Активированный Gli-1 способствует экспрессии многих генов-мишеней, которые регулируют рост, выживание и дифференцировку различных клеток, включая нейроны [8]. Экспрессия Shh активируется в нейронах во время гипоксии, а ингибирование пути Shh усугубляет ишемическое повреждение нейронов мозга у крыс, что указывает на роль Shh в регенерации нервной ткани, что можно рассматривать как защитную реакцию, направленную на выживание клетки [9]. В данной работе мы выявили хромаффинные клетки, синтезирующие Shh, число которых увеличивалось к моменту завершения роста надпочечника. Известно, что в корковом веществе активация передачи сигналов Shh коррелирует с активностью Wnt-сигналинга, которая повышается во время процесса регенерации [10]. На основании полученных нами данных можно предположить, что аналогичные процессы происходят и в хромаффинных клетках надпочечников.

Факторы транскрипции POU5F1 и Sox2 экспрессируются на ранних стадиях эмбрионального развития млекопитающих [11, 12]. POU5F1 имеет решающее значение для поддержания клетками плюрипотентности, в то время как фактор Sox2 необязателен для ее установления во время эмбриогенеза [13, 14]. В настоящем исследовании мы установили, что транскрипционный фактор POU5F1 синтезируется в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников в процессе постнатального развития. Высокое содержание тирозингидроксилазы в цитоплазме всех без исключения хромаффиноцитов указывает на их терминальную дифференцировку и значительную функциональную активность как в периоде роста мозгового вещества, так и после его завершения [15]. Эти данные означают, что выявленные и POU5F1-, и ядерный β-катенин-, и Shh-позитивные клетки являются высокодифференцированными хромаффинными клетками указывают, и указывают на отсутствие в мозговом веществе недифференцированных предшественников и низкодифференцированных клеток. Активация экспрессии POU5F1 и Shh, и их проникновение в ядра клеток указывают на возможность дедифференцировки хромаффинноцитов [16]. Аналогичные явления были выявлены и корковом веществе надпочечников взрослого организма [17, 18]. Эти данные также корреспондируют с результатами исследований других авторов, показавших возможность получения из мозгового вещества надпочечников взрослого организма клеток, способных к трансформации в дофаминергические нейроны [19]. Отсутствие экспрессии в хромаффинных клетках транскрипционного фактора Sox2 либо не является необходимым условием для поддержания регенераторного потенциала мозгового вещества надпочечников, либо его экспрессия кратковременна, поскольку имеются данные, что Sox2 необходим для индукции, а не поддержания плюрипотентного состояния [20]. В то же время, численность POU5F1- и Shh-позитивных клеток и клеток с активацией канонического Wnt-сигналинга была одинаковой, что указывает на возможное равноправное участие в процессах физиологической регенерации хромаффинных клеток.

Заключение

Таким образом, увеличение экспрессии и связывания с ДНК транскрипционного фактора POU5F1 и лиганда Shh, а также активация канонического Wnt-сигналинга в высокодифференцированных хромаффинных клетках, происходящие после завершения роста надпочечников что можно рассматривать как механизм физиологической регенерации хромаффинной ткани путем создания пула из числа дифференцированных клеток для дальнейшей дедифференцировки. Эти данные создают новое направление для исследований в нейробиологии и регенерации нервной ткани.

Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022–0035.

Литература

1. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы частной гистологии. М.: КолосС, 2011, 431 с.
2. Eiden L.E., Jiang S.Z. What's New in Endocrinology: The Chromaffin Cell. Front. Endocrinol. 2018. V. 9. 711.
3. Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Androutsellis-Theotokis A., Eisenhofer G., Vukicevic V., Licinio J., Wong M.L., Calissano P., Nisticò G., Preziosi P., Levi-Montalcini R. Chromaffin cells: the peripheral brain. Mol Psychiatry. 2012. V. 17. № 4. P. 354–358.
4. Pignatelli D., Xiao F., Gouvtia A., Ferreira J., Vinson G. Adrenarche in the rat // Journal of Endocrinology. 2006. V. 191. N. 1. P. 301–308.
5. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Назимова С.В. Роль канонического Wnt-сигналинга в морфогенезе и регенерации коркового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза. Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2019. № 1. С. 81–89.
6. Mulligan K.A., Cheyette B.N. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. J. Neuroimmune Pharmacol. 2012. V. 7. N. 4. P. 774–787.
7. Wilson N.H., Stoeckli E.T. Sonic hedgehog regulates Wnt activity during neural circuit formation. Vitamins and Hormones. 2012. V. 88. P. 173–209.
8. Ho K.S., Scott M.P. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. Current Opinion in Neurobiology. 2002. V. 12. N. 1. P. 57–63.
9. Ji H., Miao J., Zhang X., Du Y., Liu H., Li S., Li L. Inhibition of sonic hedgehog signaling aggravates brain damage associated with the down-regulation of Gli 1, Ptch 1 and SOD1 expression in acute ischemic stroke. Neuroscience Letters. 2012. V. 506. N. 1. P. 1–6.
10. Finco I., Lerario A.M., Hammer G.D. Sonic hedgehog and WNT signaling promote adrenal gland regeneration in male mice. Endocrinology. 2018. Vol. 159. P. 579–596.
11. Wu G., Schöler H.R. Role of Oct4 in the early embryo development. Cell Regen. 2014. V. 3. N. 1. 7.
12. Schaefer T., Lengerke C. Sox2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. Oncogene. 2020. V. 39. N. 2. P. 278–292.
13. Wu G., Han D., Gong Y., Sebastiano V., Gentile L., Singhal N., Adachi K., Fischedick G., Ortmeier C., Sinn M., Radstaak M., Tomilin A., Schöler H.R. Establishment of totipotency does not depend on Oct4A. Nat. Cell Biol. 2013. V. 15. N. 9. P. 1089–1097.
14. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nat Cell Biol 2007. V. 9. N. 6. P. 625–635.
15. Weihe E., Depboylu C., Schütz B., Schäfer M.K., Eiden L.E. Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. Cell. Mol. Neurobiol. 2006. V. 26. N. 4–6. P. 659–678.
16. Yang H., Liu C., Fan H., Chen B., Huang D., Zhang L., Zhang Q., An J., Zhao J., Wang Y., Hao D. Sonic Hedgehog Effectively Improves Oct4-Mediated Reprogramming of Astrocytes into Neural Stem Cells. Mol Ther. 2019. V. 27. N. 8. P. 1467–1482.
17. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В. Роль транскрипционного фактора Oct4 в постнатальном развитии и функционировании коркового вещества надпочечников. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2019. № 2. С. 114–120.
18. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Цомартова Д.А. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) нарушает транскрипционную регуляцию развития сетчатой зоны надпочечников у самцов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 170. № 11. С. 651–655.
19. Vukicevic V., Schmid J., Hermann A., Lange S., Qin N., Gebauer L., Chunk K.F., Ravens U., Eisenhofer G., Storch A., Ader M., Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M. Differentiation of chromaffin progenitor cells to dopaminergic neurons. Cell Transplant. 2012. V. 21. N. 11. P. 2471–2486.
20. Lo J.H., Edwards M., Langerman J., Sridharan R., Plath K., Smale S.T. Oct4: Sox2 binding is essential for establishing but not maintaining active and silent states of dynamically regulated genes in pluripotent cells. Genes Dev. 2022. V. 36. N. 19–20. P. 1079–1095.

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-10-13

УДК 591.443

ИЗМЕНЕНИЯ ИНВОЛЮТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТИМУСЕ ЭНДОКРИННЫМИ ДИСРАПТОРАМИ

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, Э.С. Цомартова, С.В. Назимова, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, г. Москва, Россия

Эндокринные дисрапторы – это химические вещества природного или искусственного происхождения, которые могут имитировать, блокировать или нарушать действие гормонов в организме. Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) считается одним из самых распространенных эндокринных дисраптров на планете [1]. Он обладает способностью нарушать функционирование половых, надпочечниковых и щитовидной желёз [2, 3]. Воздействие его фоновых доз на органы иммунной защиты изучены в меньшей степени. Тимус является эндокринной железой и первичным лимфоидным органом, который необходим для формирования адаптивного иммунного ответа. Он обеспечивает дифференцировку Т-клеток и их миграцию в Т-зависимые области периферических лимфоидных органов, таких как лимфатические узлы, миндалины, селезенка, пейеровы бляшки [4,5]. Среди органов иммунной защиты тимус первым подвергается возрастной инволюции [6]. Было показано, что инволюция функции тимуса нарушает опосредованный Т-клетками иммунитет и нарушает толерантность к собственным антигенам [7]. Функционирование клеток тимуса, как лимфоцитов, так и ретикулярного эпителия, испытывает сильное влияние глюкокортикоидных и половых гормонов [8, 9]. Поэтому его развитие и функционирование может нарушаться эндокринными дисрапторами. Исследования показали, что большинство известных эндокринный дисрапторов, проникают через плацентарный барьер [10]. Некоторые из них оказывают дисморфогенное действие на развивающиеся органы плода [11]. После рождения эндокринные нарушения также могут негативно влиять на программу постнатального развития. В наших предыдущих исследованиях мы выявили изменения в морфологии тимуса новорожденных крысят, подвергнутых внутриутробному воздействию низких дозы ДДТ [12].

Цель работы – оценить выраженность инволютивных изменений в тимусе крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ во время пренатального и постнатального развития.

Материалы и методы

Самки крыс весом 180–220 г. получали раствор о, п-ДДТ 20 мкг/л («Sigma-Aldrich», Сент-Луис, Миссури, США) вместо водопроводной воды с момента спаривания во время беременности и лактации. После отъема потомство самок крыс получало тот же раствор о, п-ДДТ во время постнатального развития. Контролем служило потомство, полученное от интактных самок. В эксперименте участвовали только потомки мужского пола (10 крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, и 10 контрольных крыс). Крыс выводили из эксперимента передозировкой золетила в постпубертатном периоде в возрасте 10 недель. Среднесуточное потребление ДДТ после отъема составило 2,90 ± 0,12 мкг/кг массы тела, что соответствует потреблению ДДТ человеком с пищевыми продуктами с учетом различий в метаболизме ДДТ у крыс и человека [13]. Отсутствие ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений в водопроводной воде и продуктах питания подтверждено методом газовой хроматографии в ФБУ Здравоохранени г. Москвы.

Тимус взвешивали сразу после удаления с помощью полуаналитических весов («Сартогосм», Россия), а затем фиксировали в растворе Буэна. После стандартной гистологической обработки образцы тканей заливали в парафин. Гистологические срезы тимуса окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологическое исследование проводили с помощью светового микроскопа «Leica DM2500» (Leica Microsystems Gmbh, Wetzlar, Germany). Определяли массу тела и массу тимуса, а также рассчитывали относительную массу тимуса. Пролиферирующие клетки выявляли методом иммуногистохимии с использованием антител к Ki-67 («Cell Marque», США) и набора для визуализации «UltraVision LP Detection System» («ThermoScientific», США) согласно с рекомендациями производителя. Компьютерную морфометрию проводили при помощи программного обеспечения «ImageScope» («Leica Microsystems», Германия). Исследовали следующие параметры: площадь коркового и мозгового вещества, ширина субкапсулярного слоя активно делящихся лимфобластов, а затем рассчитывали субкапсулярно-кортикальное соотношение как отношение ширины субкапсулярного слоя к толщине коркового вещества. Подсчитывали количество Ki-67-позитивных и общее количество лимфоцитов и в 1 мм^2 коркового и мозгового вещества.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения (M±m). Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ2. Статистически значимыми различия считались при $p<0,05$.

Результаты

Тимус взрослых крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, имел типичную анатомию и гистологию с отчетливо выраженным корковым и мозговым веществом. Относительная масса тимуса не отличалась от контроля. Гистологическое исследование выявило некоторые признаки ранней возрастной инволюции тимуса у контрольных крыс, такие как менее плотная клеточность коры и более выраженные стромальные элементы, очаговая гибель лимфоцитов и ощутимые тельца в коре, редкие тимусные тельца. У крыс, подвергшихся воздействию малых доз ДДТ, возрастные изменения были выражены в меньшей степени. У крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, гистоморфометрия выявила высокое соотношение коры и мозгового вещества и повышенную клеточность коры и мозгового вещества. Помимо более высокой плотности лимфоцитов, в мозговом веществе продемонстрировано изменение эпителиальных клеток тимуса. Количество тимических телец в 1 мм^2 мозгового вещества было вдвое больше, чем в контроле. Стадии развития тимических телец также различались. У интактных крыс более половины тельца находились на второй стадии развития. У крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, преобладали тимусные тельца первой стадии развития (рис. 1).

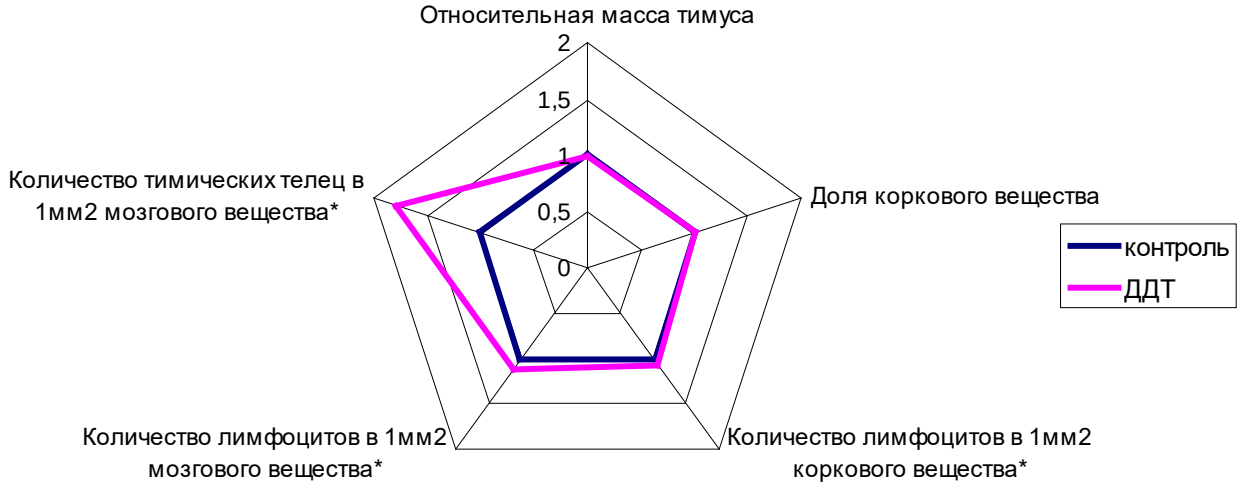


Рис. 1. Отличие морфологических характеристик тимуса крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ. Значения контрольной группы приняты за 1. * – $p<0,05$ по сравнению с контролем.

При иммуногистохимическом исследовании выявлено значительное изменение скорости пролиферации тимоцитов во всех оцениваемых компартментах. Компактный слой субкапсулярных лимфобластов у контрольных крыс был сужен и очагово дезинтегрирован. У крыс подвергавшихся воздействию ДДТ, субкапсулярные лимфобласты представляли собой более плотный интегральный слой, который был на 40 % шире, чем в контрольной группе. Помимо субкапсулярной области, во внутренней коре также обнаруживались митотически активные лимфоциты, но они располагались в коре диффузно. Процент Ki-67-позитивных лимфоцитов в 1 мм^2 коры у крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, был значительно выше, чем в контроле.

Также при иммуногистохимическом исследовании выявлены Ki-67-положительные тимоциты и в мозговом веществе. У контрольных крыс пролиферирующие лимфоциты в мозговом веществе были равномерно распределены. Их процент был вдвое меньше, чем в коре. В отличие от контроля, у крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, процент делящихся лимфоцитов был в 1,5 раза выше. Они также были диффузно распределены в мозговом веществе (рис. 2).

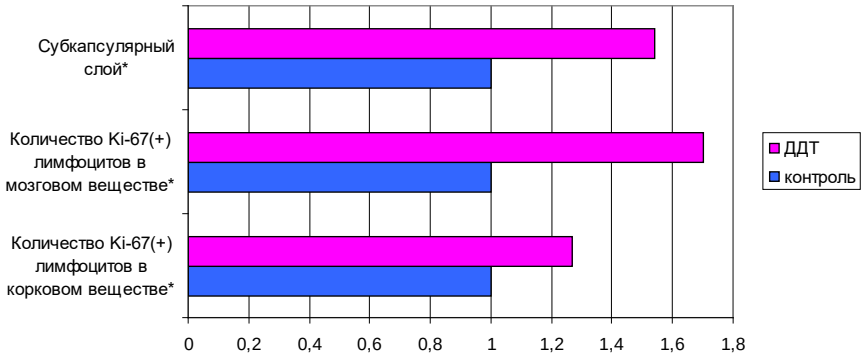


Рис. 2. Особенности пролиферативных процессов в тимусе крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ. Значения контрольной группы приняты за 1. * – p<0,05 по сравнению с контролем.

Обсуждение

Гистофизиология тимуса включает приток лимфоидных предшественников в субкапсулярную область, где они активно пролиферируют, сопутствующую дифференцировку лимфобластов в зрелые Т-клетки во внутренней коре и их эмиграцию из тимуса. Инволюция тимуса характеризуется прогрессирующей потерей массы органа, истощением коры из-за уменьшения притока клеток-предшественников из костного мозга и снижения клеточной пролиферации и дифференцировки [14]. У крыс инволюция тимуса начинается с шестинедельного возраста [15]. В настоящем исследовании на 10-недельных крысах мы обнаружили ранние возрастные изменения в тимусе контрольной группы. Иммуногистохимическая оценка клеточной пролиферации выявила истощение субкапсулярного слоя и низкую митотическую активность кортикальных и медуллярных лимфоцитов, свидетельствующую об угасании тимопоэза. У крыс, подвергшиеся воздействию ДДТ, тимус имел аналогичную контрольной группе массу и размеры коркового вещества, при этом отмечалась очаговая гибель лимфоцитов. Отличительной особенностью была более высокая клеточность коры и мозгового вещества, что отражает более активную продукцию Т-клеток. Более широкий слой лимфобластов под капсулой и более высокий процент делящихся лимфоцитов во внутренней коре свидетельствуют о том, что тимопоэз, у подвергшихся воздействию ДДТ крыс, не начинает регрессировать после полового созревания. Продукция Т-клеток в тимусе контролируется так называемыми перекрестными помехами тимуса, которые включают инициацию пролиферации, дифференцировки и миграции клеток-предшественников эпителиальными клетками тимуса, а также индукцию дифференцировки и функции эпителиальных клеток тимуса тимоцитами [16]. В настоящем исследовании мы наблюдали большее количество тимических телец у крыс, подвергшихся воздействию ДДТ. Более того, большинство телец находились в начальной стадии развития, что свидетельствует об их усиленном образовании. Возможная роль тимических телец в развитии Т-клеток до сих пор остается открытым вопросом [17,18], но исследования онтогенеза тимуса крыс показывают, что тимические тельца появляются, когда тимопоэз активен, и их количество уменьшается с возрастом одновременно с уменьшением продукции Т-клеток [19]. В нашем исследовании мы выявили более интенсивную продукцию лимфоцитов и эпителиальных клеток тимуса. Таким образом, оказывается, что тимус крыс, подвергшихся воздействию эндокринного дисраптора, был более ювенильным по сравнению с контрольной группой. Ранее мы показали, что пролиферативный ответ на Т-клеточный митоген Конканавалин А у препубертатных и пубертатных крыс был адекватен возрасту и не отличался от контроля, но после полового созревания, в возрасте 10 нед, значительно снижался [20]. Известно, что сниженный пролиферативный ответ на митоген свидетельствует о функциональной незрелости лимфоцитов, характерной для неонатального периода онтогенеза [21]. Кроме того, низкий пролиферативный ответ наблюдается в пожилом возрасте и связан со старением клеток и снижением обновления иммунных клеток [22]. Результаты настоящего исследования проливают свет на причину недостаточной пролиферативной реакции лимфоцитов. Функциональная недостаточность лимфоцитов тимуса, скорее всего, является следствием повышенного содержания низкодифференцированных пролиферирующих клеток, которые не обладают способностью полноценно отвечать на митоген.

Наши результаты свидетельствуют о том, что воздействие ДДТ в процессе развития нарушает постнатальный рост тимуса и функциональное созревание лимфоцитов тимуса. Поэтому, хорошо развитый, функционально активный вид тимуса не может считаться маркером достаточной функции Т-клеток в случае развития особи при постоянном воздействии химических веществ, нарушающих работу эндокринной системы.

Заключение

Таким образом, наши результаты показывают, что наряду с эндокринными железами ДДТ оказывает дисморфогенетическое действие и на центральные органы иммунитета, что проявляется в задержке развития тимуса, снижением миграции Т-клеток и повышенной пролиферацией тимоцитов и соответственно, в наступлении возрастной инволюции. Полученные данные показывают, что у организмов, развивающихся при воздействии низких доз ДДТ, морфологические и функциональные показатели могут отличаться от возрастных нормативных значений состояния иммунной системы.

Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022–0035.

Литература

1. World Health Organization. Pesticide Residues in Food – 2018. Toxicological Evaluations; World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO: Geneva, Switzerland, 2019; 780p.

2. Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156. № 12. С. 720–722.

3. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Влияние пренатального и постнатального воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на секрецию катехоламинов у крыс в разные периоды онтогенеза. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 4. С. 415–418.

4. Anderson G., Moore N.C., Owen J.J., Jenkinson E.J. Cellular interactions in thymocyte development. Annu. Rev. Immunol. 1996. V. 14. P. 73–99.

5. Thapa P., Farber D.L. The role of the thymus in the immune response. Thorac. Surg. Clin. 2019. V. 29. P. 123–131.

6. Calder A.E., Hince M.N., Dudakov J.A., Chidgey A.P., Boyd R.L. Thymic involution: Where endocrinology meets immunology. Neuroimmunomodulation. 2011. V. 18. P. 281–289.

7. Sheu T.T., Chiang B.L., Yen J.H., Lin W.C. Premature CD4. T cell aging and its contribution to lymphopenia-induced proliferation of memory cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. PLoS ONE. 2014. V. 9. e89379.

8. Gruver A.L., Sempowski G.D. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. J. Leukoc. Biol. 2008.V. 84. P. 915–923.

9. Singh N., Miranda K., Singh U., Nagarkatti P., Nagarkatti M. Diethylstilbestrol (DES) induces autophagy in thymocytes by regulating Beclin-1 expression through epigenetic modulation. Toxicology. 2018. V. 410. P. 49–58.

10. Mestres J., Pérez-Albaladejo E., Porte C., Postigo C. High-throughput analysis of the steroid profile in placental cell cultures to evaluate endocrine disrupting effects of contaminant exposure. J. Chromatogr. A. 2022. 1667. 462886.

11. La Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Cogliano V.J., Woodruff T.J., et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. Nat. Rev. Endocrinol. 2020. V. 18. P. 45–57.

12. Яглова Н.В. и др. Морфологические изменения тимуса новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) во внутриутробном периоде развития. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 2. С. 261–264.

13. Yamazaki H., Takano R., Shimizu M., Murayama N., Kitajima M., Shono M. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling. J. Health Sci. 2010. V. 56. P. 566–575.

14. Gruver A.L., Sempowski G.D. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. J. Leukoc. Biol. 2008. V. 84. P. 915–923.

15. Gruver A., Hudson L., Sempowski G.D. Immunosenescence of ageing. J. Pathol. 2007. V. 211. P. 144–156.

16. Kondo K., Ohigashi I., Takahama Y. Thymus machinery for T-cell selection. Int. Immunol. 2019. V. 31. P. 119–125.

17. Wang J., Sekai M., Matsui T., Fujii Y., Matsumoto M., Takeuchi O., Minato N., Hamazaki Y. Hassall's corpuscles with cellular-senescence features maintain IFNα production through neutrophils and pDC activation in the thymus. Int. Immunol. 2019. V. 31. P. 127–139.

18. Laan M., Salumets A., Klein A., Reintamm K., Bichele R., Peterson H., Peterson P. Post-Aire Medullary Thymic Epithelial Cells and Hassall's Corpuscles as Inducers of Tonic Pro-Inflammatory Microenvironment. Front. Immunol. 2021. V. 12. 635569.

19. Bodey B., Kaiser H.E. Development of Hassall's bodies of the thymus in humans and other vertebrates (especially mammals) under physiological and pathological conditions: Immunocytochemical, electron microscopic and in vitro observations. In Vivo. 1997. V. 11. P. 61–85.

20. Yaglova N.V. et al. Developmental exposure to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane impairs proliferative response of thymic lymphocytes to Concanavalin A in rats. Heliyon. 2020. V. 6. N. 3. e03608.

21. Holladay S., Smialowicz R. Development of the murine and human immune system: Differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. Environ. Health Perspect. 2000. V. 108. P. 463–473.

22. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Zanlari L., Telera A., Lucchini G., Passeri G., Monti D.; et al. The immune system in extreme longevity. Exp. Gerontol. 2008, V. 43. P. 61–65.

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-14

УДК 66.047

ИССЛЕДОВАНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ФЛАГЕЛЛИНА-С PSEUDOMONAS AERUGINOSA

А.П. Жеребцов, А.А. Калошин, Н.А. Михайлова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) является одним из основных возбудителей очаговых и генерализованных процессов у людей с ослабленным иммунитетом. Синегнойная палочка отличается множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. В связи с этим разработка эффективных профилактических вакцин и подбор адъювантов для усиления их защитных свойств от *P.ºaeruginosa* является актуальной задачей.

Известно что, флагеллины жгутиковых бактерий обладают адъювантными свойствами, активируя толл-подобный рецептор-5 врождённой иммунной системы. Взаимодействуя с рецептором TLR5, флагеллины запускают провоспалительный фактор транскрипции NF-kB через адаптерный белок MyD88, который вызывает продукцию противовоспалительных цитокинов. В исследованиях in vivo показано, что иммунизация мышей рекомбинантным флагеллином вызывала Т-клеточный ответ и оказывала защитный эффект в отношении токсических воздействий бактерий, вирусов и радиаций. Таким образом, флагеллин посредством стимуляции механизмов врожденного иммунитета усиливает адаптивные иммунные реакции организма. По литературным данным известно, что флагеллин Salmonella tiphimurium обладает адъювантными свойствами, однако влияние флагеллина *P.ºaeruginosa* на иммунную систему изучено не достаточно.

Цель работы – исследование влияния рекомбинантного флагеллина-С (FlicC) *P.ºaeruginosa* на формирование протективного иммунитета.

Материалом исследования служил рекомбинантный флагеллин-С *P.ºaeruginosa* полученный в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Антиген использовали для изучения протективных и адъювантных свойств в опытах по инфицированию иммунизированных животных неродственным штаммом № 204 Klebsiella Pneumoniae и штаммом PA-103 *P.ºaeruginosa*. Для постановки экспериментов формировали 4 группы беспородных мышей массой 14–16 грамм, численностью по 40 особей, которым двукратно внутрибрюшинно с интервалом в 14 дней вводили тестируемые препараты: 1) рекомбинантный FlicC в дозе 50 мкг, 2) FlicC 50 мкг + K.ºpneumoniae 50 мкг, 3) K.ºpneumoniae 50 мкг, 4) FlicC 50 мкг + K.ºpneumoniae 50 мкг. В качестве контроля заражающей культуры использовали чистых мышей. Через 14 дней после иммунизации в группах 1 и 2 проводили заражение животных различными дозами живой вирулентной культуры P.ºaeruginosa, а особей групп 3 и 4 заражали различными дозами K.ºpneumoniae с последующим подсчетом индекса эффективности через 7 дней после введения препаратов. У пяти животных из каждой группы забирали кровь и в сыворотке определяли титры специфических антител в ИФА. Значимость различий оценивали с использованием критерия достоверности Стьюдента (t), критическое значение уровня значимости принималось равным 5 % ($p<0,05$).

В группе мышей иммунизированных рекомбинантным флагеллином-С определен наибольший титр специфических антител в пределах разведения 1:512000, что свидетельствовало об иммуногенных свойствах белка. Индекс эффективности в этой группе соответствовал (3,0), что наглядно демонстрирует протективную защиту против родственного штамма PA-103 *P.ºaeruginosa*. В группе мышей получивших рекомбинантный FlicC + *K.ºpneumoniae* индекс эффективности соответствовал (6,1), при заражении штаммом № 204 K.ºpneumoniae, а при заражении штаммом PA-103 P.ºaeruginosa ИЭ* соответствовал (5,6). Значимость различия между группами иммунизированных и контролем интактных мышей составила ($p<0,01$).

Таким образом, в ходе проведенных исследований показано, что рекомбинантный флагеллин-С *P.ºaeruginosa* как самостоятельный иммуноген обладал протективной активностью против родственного штамма, а так же проявлял адъювантные свойства с антигеном K.ºpneumoniae, увеличивая его иммуногенность, сочетанная иммунизация рекомбинантного FlicC + K.ºpneumoniae приводила к увеличению индекса эффективности протективных свойств изучаемых антигенов и свидетельствовало об их перекрестной защите.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-15-18

УДК 66.047

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕСКЛЕТОЧНЫХ КОКЛЮШНЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОПЛЕНОЧНОЙ И ПЛАНКТОННОЙ КУЛЬТУР BORDETELLA PERTUSSIS

Е.М. Зайцев, М.В. Брицина, М.Н. Озерецковская, А.Е. Зайцев

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение

Коклюш остается актуальной проблемой здравоохранения во всем мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации, где начиная с 1990-х годов отмечается рост заболеваемости коклюшем, увеличение тяжести течения заболевания и летальности [1–3]. Наряду с другими факторами, одной из вероятных причин продолжающейся циркуляции возбудителя коклюша может быть персистенция в респираторном тракте биопленок B. pertussis, отличающихся от планктонных клеток повышенной устойчивостью к иммунной системе хозяина и антибактериальным препаратам. Существующие бесклеточные вакцины против коклюша содержащие антигены, выделенные из планктонных культур B. pertussis, защищают привитых от коклюша, однако недостаточно эффективно влияют на циркуляцию вирулентных штаммов B. pertussis [4]. В связи с этим, перспективным направлением совершенствования вакцинопрофилактики коклюшной инфекцией является создание вакцин нового поколения на основе использования антигенов, выделенных из биопленочных культур *B. pertussis* [5].

Цель работы – изучение протективной активности обезвреженных коклюшных антигенных комплексов (БКВ), выделенных из биопленочной и планктонной культур *Bordetella pertussis*.

Материалы и методы

Штаммы *B. pertussis*: штамм № 317 (серовариант 1.2.3), выделенный в РФ от больного коклюшем в 2003 г. от 8-ми летнего больного ребенка, депонирован в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России 15.09.2017 г., патент № 2689903, может быть использован для производства бесклеточных коклюшных вакцин; нейротропный штамм № 18323.

Животные: Мыши-гибриды F_1 (CBAxC$_{57}$ Bl$_6$) массой 12–14 и 14–16 г., получены из питомника «Андреевка» Московской области.

Питательные среды: питательная среда для культивирования и выделения коклюшного микроба сухая («Бордетелагар»), ФБУН ГНЦПМБ г. Оболенск; жидкая синтетическая питательная среда (ЖСС), содержащая аминокислоты, соли и витамины. Планшеты плоскодонные 96-луночные полимерные для иммунологических реакций однократного применения «Linbro», США. Флаконы пластиковые культуральные, «SPL Life Sciences», Республика Корея, (площадь 175 см^2). Чашки Петри пластиковые, диаметр 9 см, ПО «Ленмедполимер», РФ. Краситель Генциан-Виолет (0,1 %). Этанол 95 %. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ).

Культивирование штаммов B. pertussis. Контроль морфологических, серологических и культуральных свойств штаммов *B. pertussis* проводили в соответствии с Методическими указаниями [6].

В ампулы с лиофилизированными культурами вносили стерильный физиологический раствор в объеме 0,5 мл. Полученную взвесь вносили пастеровской пипеткой в 2 пробирки со средой «Бордетелагар» взвесь равномерно распределяли по поверхности среды. Пробирки выдерживали в термостате при температуре (37,0±0,5) °С в течение 3 суток – 1 пассаж. Выросшие колонии переносили в 8 пробирок со средой «Бордетелагар» и выдерживали в термостате при температуре (37,0±0,5) °С 2 суток – 2-ой пассаж. Культуры с пробирок 2 пассажа смывали в 2 колбы с рабочим объемом 200 мл, заполненных жидкой синтетической питательной средой – 3 пассаж. Колбы переносили в шуттель-аппарат и культивировали при температуре (37,0±0,5) °С в течение 12 часов – 4 пассаж (маточная культура для посевов на культуральные флаконы). Культуру из колб пересевали в пластиковые культуральные флаконы с жидкой питательной средой. Расчетная посевная доза составляла 5,0–6,0 МОЕ/мл. Для получения биопленочных культур культуральные флаконы помещали в термостат с температурой (37,0±0,5) °С в горизонтальном положении (в стационарных условиях) и выдерживали в течение 5 суток.

Для получения планктонных культур культуральные флаконы помещали в шуттель-аппарат и шуттелировали в течение 5 суток при температурой (37,0±0,5) °С. После выращивания отбирали пробы из каждого флакона и определяли концентрацию микробной массы. Концентрация микробной массы, выращенной при статическом культивировании и при шуттелировании составляла 50 млрд микробных клеток.

Интенсивность образования биопленок в культуральных флаконах оценивали окрашиванием 0,1 % раствором генциан-виолета по показателям оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю ($ОП_к$ = 0,047), как плотные (ОП≥0,188), умеренные (0,094≤ОП<0,188), слабые (0,070≤ОП<0,094), отсутствие биопленок (0,047<ОП<0,070) в соответствии с ранее описанным методом [7].

Получение БКВ из биопленочных и планктонных культур *B. pertussis*. БКВ из биопленочных и планктонных культур B. pertussis были изготовлены в соответствии с ранее описанным методом получения бесклеточной коклюшной вакцины [8]. Культуры, выращенные в культуральных флаконах центрифугировали при 12500 об/мин в течение 40±5 минут при t +4 °С. Надосадочную жидкость переливали в колбы и методом кислотного осаждения выделяли антигенные комплексы коклюшного микроба (с помощью гексометофасфата натрия, серной, соляной и трихлоруксусной кислот) снижая pH до 3,4±0,05 при постоянном перемешивании). Осадок отделяли центрифугированием при 12500 об/мин в течение 60±5 минут при t +4 °С, растворяли его в фосфатном буферном растворе pH 7,4±0,1 с конечной pH 7,5–7,7 и гомогенизировали на электрическом гомогенизаторе в течение 12 секунд. Определение концентрации белка в суспензии антигенных комплексов проводили по методу Лоури. Содержание белка в суспензии антигенного комплекса из биопленочной культуры составляло 990 мкг/мл, а из планктонной – 1470 мкг/мл. Обезвреживание (детоксикацию) антигенных комплексов B. pertussis проводили формалином до концентрации 0,4 % с добавлением сахарозы (10 %) в течение 20 суток при периодическом встряхивании при температуре (37,0±0,5) °С. Для иммунизации животных препараты сорбировали на геле гидроокиси алюминия в таком соотношении, чтобы в 1 мл смеси содержалось 50 мкг белка, 0,3 мг алюминия гидроксида и ФСБ до 1 мл.

Оценка гистаминсенсибилизирующей активности. Контроль полноты детоксикации препаратов проводили методом определения гистаминсенсибилизирующей активности. Мышей – самок линии F_1 ($CBAxC_{57}$ BL_6), весом 14–16 г., иммунизировали однократно двумя вариантами БКВ в дозах 12,5, 25,0 и 50,0 мкг. Через 12 дней иммунизированным мышам вводили гистамин дигидрохлорид в дозе 2 мг и учитывали гибель животных через 1 и 24 часа. Величину гистаминсенсибилизирующей активности ($ГСД_{50}$) рассчитывали по формуле Кербера в модификации Ашмарина [9].

Оценка протективной активности БКВ. Протективные свойства БКВ оценивали в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [10] на модели развития менингоэнцефалита у мышей, зараженных нейротропной вирулентной культурой B.pertussis штамм 18323.

Испытуемыми препаратами («БКВ-Б» и «БКВ-П») иммунизировали 2 группы мышей линии F_1 ($CBAxC_{57}$ BL_6), весом 12–14 г. по 15 голов в каждой дозой 25 мкг на мышь. Контрольную группу составляли интактные мыши. Спустя 14 дней после иммунизации, мышей заражали интрацеребрально B. pertussis штамм 18323 в дозе 100000 микробных клеток и наблюдали за ними в течение 14 суток, ежедневно регистрируя число выживших животных. Опыт сопровождали контролем $ЛД_{50}$ вирулентной коклюшной культуры.

Изучение персистенции микробных клеток в легких мышей при интраназальном заражении вирулентным штаммом. Двум группам мышей гибридов F_1 ($CBAxC_{57}$ BL_6), весом 12–14 г., однократно внутрибрюшинно вводили БКВ-Б и БКВ-П в дозе 25 мкг. Контрольную группу составили интактные мыши. На 14 сутки после иммунизации мышей опытных и контрольной группы заражали интраназально нейротропной вирулентной культурой *B. pertussis* штамм 18323 в дозе 100 млн микробных клеток в объеме 0,02 мл. На 5, 14,21 сутки после заражения у мышей, получавших эфирный наркоз, асептически извлекали легкие, промывали их стерильным изотоническим раствором натрия хлорида, гомогенизировали в 2 мл изотонического раствора натрия хлорида и производили посев 0,1 мл гомогенатов на чашки Петри со средой «Бордетелагар». Чашки помещали в термостат при t (37,0±0,5) °С на 3 суток, после чего производили учет результатов (оценку интенсивности роста и подсчет отдельных колоний).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований была разработана методика культивирования биопленок *B. pertussis* в пластиковых культуральных флаконах, установлены оптимальные условия культивирования, оптимальные посевные дозы микробных клеток и время культивирования. Установлено, что биопленки формировались только при стационарном выращивании культур, при слабом росте планктонных клеток. При культивировании в шуттель аппарате не наблюдалось формирования биопленок, при высокой концентрации планктонных клеток. Наиболее высокая интенсивность образования биопленок (плотные биопленки) наблюдалась на пятые сутки культивирования при посевной дозе 2,5–5,0 Международных оптических единиц (МОЕ). Таким образом, биопленки формировались только при стационарном выращивании культур, при слабом росте планктонных клеток, по сравнению с культивированием в шуттель аппарате.

Из биопленочных и планктонных культур штамма B.pertussis № 317 были выделены антигенные комплексы на основе которых были изготовлены два варианта БКВ: БКВ – Б и БКВ – П, изучены их безвредность и протективная активность.

При изучении гистаминсенсибилизирующей активности БКВ было установлено, что оба препарата в изучаемых дозах были безвредны и не вызывали гибели мышей при введении гистамина дигидрохлорида, что свидетельствует о безвредности БКВ и полной детоксикации препаратов.

Далее были изучены протективные свойства, полученных вариантов БКВ (таблица № 1). Начало гибели в группе мышей, иммунизированных БКВ-Б отмечена на 5 сутки и продолжалась до 12 дня (срок наблюдения), а в группе мышей, иммунизированных БКВ-П начало гибели мышей была отмечена уже на 4 сутки и закончилась на 8 сутки. При этом в группе мышей, иммунизированных БКВ-Б выжило 33 %, а в группе мышей, иммунизированных БКВ-П выжило 13 %. Относительно низкая доля выживших животных в обеих группах обусловлена высокой дозой введенной культуры вирулентного штамма. $ЛД_{50}$ культуры была равна 58 микробным клеткам и, соответственно мышам было введено 1724 $ЛД_{50}$ (по рекомендациям ВОЗ должно быть введено не менее 100 $ЛД_{50}$ и не более 1000 $ЛД_{50}$). Тем не менее, из приведенных данных видно, что протективная активность БКВ-Б была практически в 3 раза выше, чем БКВ-П.

Таблица № 1. Протективная активность БКВ при интрацеребральном заражении

Препарат	Доза в мкг/мышь	Кол-во мышей на дозу	Гибель мышей (сутки после заражения)								Количество выживших	
			4	5	6	7	8	9	11	12	Абс.	%
БКВ-Б	25	15	-	5	2	-	1	-	1	1	5	33
БКВ – П	25	15	5	5	2	-	1	-	-	-	2	13
Контроль культуры вирулентного штамма	Количество микробных клеток/мышь	Кол-во мышей на дозу	Гибель мышей (сутки после заражения)								Количество павших	
			4	5	6	7	8	9	11	12	Абс.	%
	80	10	5	2	-	-	1	-	-	-	8	80
	400	10	6	1	-	-	1	-	1	-	9	90
	2000	10	6	4	-	-	-	-	-	-	10	100
	10000	10	4	6	-	-	-	-	-	-	10	100
Заражающая доза/$ЛД_{50}$	100000/1724	10	8	2	-	-	-	-	-	-	10	100

В последующих опытах было изучено влияние полученных вариантов БКВ на персистенцию микробных клеток *B. pertussis* в легких мышей зараженных интраназально культурой вирулентного штамма (таблица № 2).

Из приведенных в таблице № 2 данных видно, что БКВ-Б и БКВ-П существенно отличались между собой по влиянию на уровень колонизации легких микробными клетками B. pertussis. В группе БКВ-Б на 5 сутки был зарегистрирован рост отдельных колоний в количестве от 156 до 185 в первом опыте и от 151 до 195 во втором. На 14 сутки количество колоний снизилось до 37–44 в первом опыте и 54–60 во втором, а на 21 сутки роста не было. В группе БКВ-П на 5 сутки у большинства мышей был выявлен сплошной рост культуры. На 14 сутки культуры представляли собой отдельные колонии с участками сливного роста. На 21 сутки регистрировались отдельные колонии в количестве от 173 до 187 в первом опыте и 113–146 во втором. Микробные клетки росли на плотной питательной среде в виде характерных для *B.pertussis* – мелких колоний от 0,5 до 1,0 мм в диаметре, выпуклых, круглых,

с ровными краями, сероватого цвета, блестящих (в виде "жемчужин"), полупрозрачных. В мазках, окрашенных по Граму, при микроскопии (объектив 90^x окуляр 7^x) микробные клетки представляли собой типичные для *B.pertussis* грамотрицательные, овоидной формы, мелкие палочки (коккобактерии), располагавщиеся в мазках отдельно или парами. На отдельных участках питательной среды у части чашек Петри был зарегистрирован рост колоний, не характерных для *B.pertussis*, вероятно за счет контаминации другими микроорганизмами. В целом, приведенные данные указывают на более высокое снижение уровня колонизации легких микробными клетками *B.pertussis* у мышей, иммунизированных БКВ-Б, по сравнению с БКВ-П.

Таблица № 2. Персистенция микробных клеток B. pertussis в легких мышей при интраназальном заражении (рост посевов гомогенатов легких на плотной питательной среде)

Препарат	Общее кол-во мышей/	Опыт I			Опыт II		
		Интенсивность роста культур (сутки после заражения)					
		5	14	21	5	14	21
БКВ-Б	30	185*	40*	-	195*	60*	-
		160*	44*	-	187*	54*	-
		156*	38*	-	151*	63*	-
		178*	37*	-	193*	58*	-
		183*	42*	-	186*	56*	-
БКВ-П	30	Сплошной	>200	180*	Сплошной	Сплошной	120*
		Сплошной	>200	173*	Сплошной	>200	146*
		>200	>200	187*	Сплошной	>200	113*
		Сплошной	>200	>200	Сплошной	Сплошной	90*
		Сплошной	>200	179	Сплошной	>200	125*
Контроль культуры вирулентного штамма (неиммунизированные мыши)	12	Сплошной	Сплошной	>200	Сплошной	Сплошной	>200
		Сплошной	Сплошной	>200	Сплошной	Сплошной	>200
Интактные мыши	12	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
(–) – отсутствие роста, (*) – количество отдельных колоний, (>200) – более точный подсчет затруднен (сливной рост на отдельных участках)							

Заключение

Приведенные данные свидетельствуют о более высокой протективной активности БКВ из биопленочной культуры B. pertussis, по сравнению с БКВ из планктонной культуры. Более высокая протективная активность БКВ-Б может быть обусловлена более высоким уровнем экспрессии протективных антигенов B. pertussis биопленками, по сравнению с планктонными культурами.

Литература

1. Ломоносова А.В. Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(5):492 – 52. DOI:https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11.

2. Yeung K.H.T., Duclos P., Nelson E.A.S., et al. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study // Lancet Infect. Dis. 2017; 17(9):974–980. doi: 10.1016/S1473–3099(17)30390–0.

3. Fullen A.R, Yount K.S, Dubey P., et al. Whoop! There it is: The surprising resurgence of pertussis // PLoS Pathog. 2020; 16(7):e1008625. doi:10.1371/journal.ppat.1008625.

4. Cattelan N., Dubey P., Arnal L. Et al. Bordetella biofilms: a lifestyle leading to persistent infections // Pathog. Dis. 2016; 74(1). DOI: 10.1093/femspd/ftv108.

5. Carriquiriborde F. et al. Vaccine Candidate Based on Outer Membrane Vesicles Derived From Biofilm Culture. Front Immunol. 2021; 12: 730434. doi: 10.3389/fimmu.2021.730434.

6. МУК 4.2.2317–08 Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. Москва. 2009].

7. Зайцев Е.М. и др. Культивирование биопленок Bordetella pertussis на абиотическом субстрате // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019; (1):49-53. DOI:10.36233/0372-9311-2019-1-49-53.

8. Зайцев Е.М. и др. Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежевыделенных и вакцинного штаммов Bordetella pertussis с различными генотипическими характеристиками. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021; 20(4):68–72. https://doi.org/10.31631/2073–3046–2021–20–4–68–72

9. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: 1962.

10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунологические лекарственные препараты). Ч. 2 МЗ РФ. Москва 2012.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-19-20

УДК 66.047

БАКТЕРИИ BACILLUS SUBTILIS – ПРОДУЦЕНТЫ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ

С.А. Лазарев, Е.О. Калиниченко, С.А. Сходова, Н.А. Михайлова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение

Бактерии *Bacillus subtilis* известны своим положительным влиянием на иммунную систему человека. С одной стороны, данный эффект связан с высокой антагонистической активностью сенной палочки в отношении патогенных микроорганизмов и способностью стимулировать рост индигенной микробиоты. Это приводит к нормализации микробиоценоза, который, в свою очередь, обеспечивает колонизационную резистентность организма. С другой стороны, ряд исследований демонстрирует, что бактерии *B. subtilis* способны повышать неспецифический и специфический иммунный ответ. Введение сенной палочки вызывает активацию макрофагов, что приводит к усилению синтеза и высвобождению провоспалительных цитокинов. В результате развивается комплексный воспалительный ответ, направленный на уничтожение патогена. Кроме того, бактерии *B. subtilis* способствуют активации и пролиферации Т- и В – лимфоцитов за счет прямого действия пептидогликанов и тейхоевых кислот, и усиленного высвобождения цитокинов из макрофагов [1, 2]. Механизмы, с помощью которых сенная палочка активирует макрофаги, продолжают изучаться.

В научной литературе обсуждается вопрос о способности бактерий продуцировать цитокины (цитокино-подобные вещества – ЦПВ) [3]. В ряде исследований показано их наличие в культуральных супернатантах некоторых условно патогенных бактерий: стафилококки, энтерококки, эшерихии и др. [4, 5]. Поскольку *B. subtilis* являются мощными продуцентами различных биологически активных веществ, можно предположить, что их иммуностимулирующее действие обусловлено синтезом ЦПВ.

Цель работы – исследовать метаболиты штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 на наличие в них ЦПВ.

Материалы и методы

В работе использовали пробиотические штаммы *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Для получения метаболитов проводили глубинное периодическое культивирование. Полученную биомассу отделяли центрифугированием с последующей микрофильтрацией супернатантов [6, 7].

Наличие ЦПВ в культуральных фильтратах определяли на проточном цитометре FC-500 («Beckman Coulter», США) с использованием набора «Human Inflammation 18-Plex Kit» («Antigenix America», США). В качестве контроля использовали стерильную питательную среду.

Результаты представляли средним арифметическим ± стандартное отклонение (M±SD). Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия «Манна-Уитни» при уровне достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты

Из полученных данных, представленных в таблице 1, видно, что в фильтратах культуральных супернатантов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 определяются вещества, подобные цитокинам. При этом наличие и концентрация выявленных ЦПВ зависели от штамма сенной палочки. Наиболее активными продуцентом оказался штамм *B. subtilis* 1719, в фильтратах которого идентифицировали IL-1β в относительно высокой концентрации (1741,25 пкг/мл), IL-1α (109,55 пкг/мл), IL-31 (52,07 пкг/мл), IL-13 (28,24 пкг/мл) и IL-33 (5,73 пкг/мл). Культура *B. subtilis* 3Н также синтезировала IL-1β и IL-31. Однако концентрация первого ЦПВ в сравнении со штаммом *B. subtilis* 1719 была значимо ниже – в 9,3 раза (186,43 пкг/мл). Достоверных различий по содержанию в фильтратах цитокина IL-31 не выявили ($p>0,5$). При этом у штамма *B. subtilis* 3Н определено наличие IL-8 (6,74 пкг/мл), отсутствующего в метаболитах *B. subtilis* 1719. Так как все идентифицированные вещества относятся к провосполительным цитокинам, можно предположить, что именно за счет их продукции сенная палочка оказывает иммуностимулирующее действие. Ранее, при изучении влияния клеток штамма *B. subtilis* 1719 на показатели иммунитета в опытах in vivo, установлено, что однократное пероральное введение культуры приводило к увеличению цитокинов IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFNγ

в сыворотках лабораторных животных. При этом наиболее значимо возрастало количество IL-1β [2]. Эти данные, на наш взгляд, коррелируют с полученными результатами данного эксперимента и могут подтверждать биологическое действие ЦПВ сенной палочки.

Таблица 1. Концентрация цитокинов в фильтратах *B. subtilis*

Цитокин	Концентрация (пкг/мл) (M±SD)	
	subtilis 3H	*subtilis* 1719
IL-8	6,74±1,93	0*
MIP-1β	0	0
IL-4	0	0
TNFα	0	0
IP-10	0	0
IL-17A	0	0
IL-13	0	28,24 ±13,55*
MCP-1	0	0
IL-27	0	0
IL-31	39,36±11,45	52,07±9,54
IL-33	0	5,73±1,98*
IL-1β	186,43±83,42	1741,25±167,33*
IL-10	0	0
IL-6	0	0
IL-1α	0	109,55±9,29*
IFNγ	0	0
MIP-1α	0	0
Примечание. «*» – p≤0,05		

Заключение

В результате проведенного эксперимента установлено, что пробиотические бактерии *B. subtilis* 3H и *B. subtilis* 1719 в процессе роста продуцируют штаммоспецифические вещества, подобные цитокинам. Полученные данные открывают дальнейшую перспективу для изучения ЦПВ, синтезируемых бактериями *B. subtilis*. Представляет интерес выявить их сходства / различия с цитокинами макроорганизма и с ЦПВ условно патогенных бактерий, а также изучить возможность их биотехнологического применения.

Литература

1. Савустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе Bacillus subtilis. Актуальная инфектология. 2016, 2(11):35–44.

2. Гатауллин А.Г. Биологические свойства штаммов Bacillus subtilis, перспективных для создания новых пробиотиков. Дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2005. 131 С.

3. Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Лазарев С.А. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека – основа создания нового поколения пробиотических препаратов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020, 4:346–355. DOI: 10.36233/0372–9311–2020–97–4–7.

4. Зурочка А.В., Дукардт В.В. Зурочка В.А. Бактерии как продуценты цитокино-подобных веществ. Российский иммунологический журнал. 2017, 11; 3(20):374–376.

5. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Фомина Л.О. Оценка цитокиноподобной активности Staphylococcus aureus в зависимости от наличия генетических детерминант стафилококкового белка А. Российский иммунологический журнал. 2019, 13; 3(22):1163–1167. DOI: 10.31857/S102872210007247–6

6. Лазарев С.А, Арзуманян В.Г., Михайлова Н.А. Влияние состава питательной среды на прирост биомассы и синтез противомикробных метаболитов пробиотических штаммов Bacillus subtilis. Бактериология. 2021, 6(2):38–42. DOI: 10.20953/2500–1027–2021–2–38–42.

7. Lazarev S.A., Mikhailova N.A., Voevodin D.A. The Effect of Biologically Active Substances on Bacillus subtilis Growth and Functional activity. KNE life sciences. Vol. 2022. P. 501–506. DOI: 10.18502/kls.v7i1.10472.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-21-25

УДК 677.494:677.46

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И СВОЙСТВА УЛЬТРАТОНКИХ ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА

А.А. Ольхов[1,2], Ю.Н. Зернова[2], В.С. Маркин[2], Р.Ю. Косенко[2], А.Л. Иорданский[2]

ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», Москва, Россия
Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия
Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля Российской академии наук, Москва, Россия

Для создания медицинских изделий (полимерных матриц, имплантатов и др.), характеризующихся высокой скоростью биодеградации в живом организме (биорезорбцией), необходимо создавать материалы с малой плотностью и высокой удельной поверхностью. Наиболее оптимальным решением являются нетканые волокнистые материалы, состоящие из наноразмерных и микронных волокон, получаемых методом электроформования [1]. Этот метод представляет сложный многопараметрический процесс, который определяется значительным числом характеристик, влияющих как на геометрию и структуру единичных филаментов, так и на эксплуатационное поведение нетканого фибриллярного материала [2]. Основными характеристиками электроформования являются: электропроводность и вязкость, на которую влияют концентрация и молекулярная масса полимера [3]. На процесс электроформования и морфологию нетканого материала влияют также факторы внешней среды, а также технологические параметры процесса: производительность, расстояние между электродами, форма электродов, диаметр капилляра, скорость течения струи полимерного раствора и некоторые другие [4].

Использование дополнительных функциональных компонентов в полимерном растворе также может оказать влияние на структурную организацию волокон. При этом очень важно исследовать влияние особенностей структурной иерархии на эксплуатационные характеристики материалов, которая в дальнейшем будет оказывать определяющую роль в кинетике процессов диффузионного транспорта и деструкции (окслительной, фотоокислительной, биодеструкции и др.). В связи с этим возникает необходимость в установлении взаимосвязи между факторами внешнего воздействия и изменении параметров структуры полимерного материала. Установление такой взаимосвязи позволяет целенаправленно изменять свойства полимерной системы в зависимости от области применения данного изделия.

Одним из прогрессивных полимеров, применяющихся в медицине, является поли-(3-гидроксибутират) (ПГБ). Этот бактериальный биополимер обладает высокой кристалличностью [5]. Поэтому, изменяя степень кристалличности полимера на стадии формирования пленок или волокон из раствора, можно регулировать в широких пределах их транспортные свойства. Как правило, для большинства биополимеров повышенная температура отрицательно сказывается на их структуре, поэтому формование изделий на их основе, проводится из растворов. Это особенно важно для изделий медицинского назначения, например, матриц для контролируемого высвобождения лекарственных препаратов, поскольку число лекарственных веществ, способных выдерживать относительно высокие температуры, не велико.

В настоящей работе исследована структурная организация нетканых волокнистых материалов ПГБ в зависимости от технологических параметров процесса электоформования, а также полярных низкомолекулярных веществ, придающих материалам функциональные свойства.

Материалы и методы

ПГБ фирмы «Biomer» (Германия) с $M_\eta = 3{,}0\times10^5$, $4{,}6\times10^5$, $8{,}5\times10^5$. Растворители химически чистые – диоксан, хлороформ, муравьиная кислота и дихлорэтан. Тетрабутиламмоний йодид (ТБАИ) $\{[CH_3(CH_2)_3]_4N\}$ применяли в процессе электроформования в качестве добавки для увеличения электропроводности формовочного раствора. Электроформование (ЭФВ) нетканых волокнистых материалов на основе ПГБ осуществляли на опытной лабораторной установке при напряжении электрического поля 15 кВ, расстоянии между электродами 18 см, диаметре капилляра 0,1 мм. В качестве добавок были использованы дипиридамол-(2,2',2",2'"-[(4,8-ди-1-пиперидинилпиримидо[5,4-d]пиримидин-2,6-диил)динитрило]тетракис[этанол])(«хч») с молекулярной массой 504,53 г./моль

(ДПД) и комплекс хлорида железа с тетрафенилпорфирином (FeCl-ТФП). ЭПР спектры (X-диапазона) регистрировались на автоматизированном ЭПР спектрометре ЭПР-В (ИХФ РАН, Москва). При записи спектров амплитуда модуляции всегда была существенно меньше ширины резонансной линии и не превышала 0,5 Гс. В качестве зонда использовали стабильный нитроксильный радикал 2,2,6,6 – тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО). Радикал вводили в волокна из газовой фазы при температуре 50 °С в течение часа. Исследование образцов методом ДСК было проведено на приборе DSC 204 F1 фирмы Netzsch в инертной среде аргона (Ar) со скоростью нагрева 10 °С/мин. Геометрию волокнистых материалов исследовали методом электронной микроскопии с помощью сканирующего электронного микроскопа «Hitachi TM-1000» (Япония) при ускоряющем напряжении 20 kV. На поверхность образца нетканого волокнистого материала напыляли слой золота толщиной 100–200 Å. Кристаллическую структуру образцов изучали рентгенографическим методом, используя дифрактометры HZG-4 (Ni-фильтр) и ДРОН-3М (Россия) (графитовый плоский монохроматор) на CuK_{α}-излучении (съемка на отражение).

Результаты и обсуждения

Одним из важных технологических аспектов формования пленочных или волокнистых материалов является выбор растворителя для базового полимера. Растворители отличаются не только по температуре кипения, молекулярной массе, но и по степени полярности. Рассмотрим влияния полярности растворителей на надмолекулярную структуру матриц ПГБ. Для этого мы использовали метод дифференциального калориметрического анализа. Из анализа термограмм следует, что после обработки растворителями исходная структура ПГБ нарушается: появляется аморфная фаза, характеризуемая явно выраженным переходом стеклования и возникает мелкокристаллическая модификация или области с нарушенной кристалличностью. Об этом свидетельствует появление низкотемпературного пика плавления на термограммах.

Таблица 1 – Теплофизические характеристики ПГБ пленок из различных растворителей.

Растворитель	ΔG_m, Дж/г	T_m, ° С	T_g, ° С	ΔC_p, Дж/г К	μ, D	$e^{1/2}$
	параметры полимерного материала				параметры растворителя	
Диоксан	– 0,076	174	63,0	0,39	0,45	10,05
Хлороформ	– 0,140	175	53,9	0,24	1,15	9,3
Муравьиная кислота	– 0,106	176	-	-	1,4	13,5
Дихлорэтан	– 0,173	179	74,0	0,1	2,06	9,0

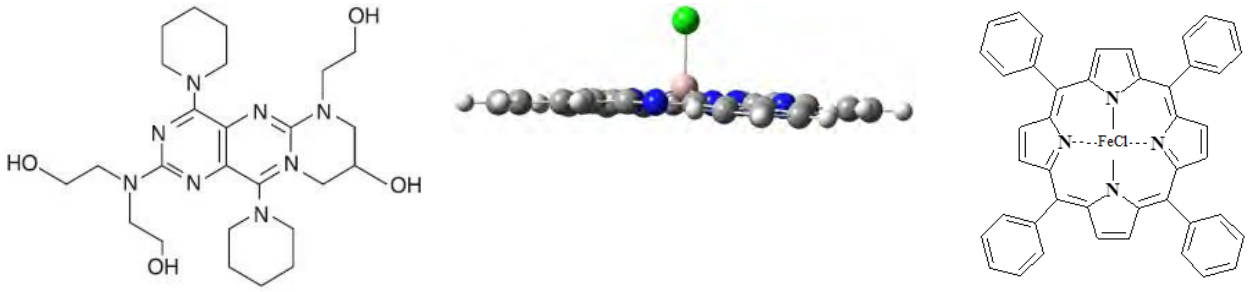
ΔG_m, Дж/г – энергия Гиббса плавления; T_m, °С – температура плавления; T_g, °С – тепперaтура стеклования; ΔC_p, Дж/г К – удельная теплоемкость; $e^{1/2}$ - плотность энергии когезии. μ, D – дипольный момент

В таблице 1 представлены теплофизические показатели пленок на основе ПГБ и параметры растворителей. Из таблицы видно, что с ростом дипольного момента растворителя происходит совершенствование (упорядочение) кристаллической фазы ПГБ. Об этом свидетельствует рост температуры плавления полимера. Одновременно с этим уменьшается теплоемкость ПГБ. Это может быть связано с уменьшением доли аморфной фазы полимера. С увеличением полярности растворителя увеличивается его способность вступать во взаимодействие с полярными группами ПГБ, приводящее к совершенствованию кристаллитов и уплотнению морфной фазы полимера в процессе формирования пленки или волокна. Как видно из табл. 1, характер изменения энергии Гиббса плавления кристаллической фазы ПГБ и величина плотности энергии когезии молекул растворителя хорошо коррелируют в определенной последовательности. Известно, что величина плотности энергии когезии характеризует степень межмолекулярного взаимодействия в веществе. Из табл. 1 следует, что с уменьшением степени межмолекулярного взаимодействия в растворителе увеличивается беспорядок в кристаллической фазе пленок ПГБ, характеризующийся уменьшением энергии Гиббса плавления. Другими словами, чем меньше межмолекулярное взаимодействие в растворителе, тем выше подвижность его молекул и, следовательно, выше скорость их перехода в парообразную фазу (испарение). Вследствие различной скорости фазового перехода молекул рассматриваемых растворителей, формирование пленок или волокон ПГБ протекает по-разному. Это выражается в степени завершенности процесса кристаллизации.

На основании проведенных исследований, можно заключить, что с увеличением полярности растворителя происходит увеличение и совершенствование кристаллической структуры и уменьшается доля аморфной фазы ПГБ. При этом было установлено, что наиболее качественные пленки или волокна формуются из хлороформа.

Помимо характеристик растворителя важными для формирования структуры волокна являются параметры полимерного раствора. В этой связи ниже будет дано рассмотрение некоторых ключевых физико-химических характеристик полимерных растворов ПГБ, предназначенных для электроформования. Геометрическими показателями моноволокна в первую очередь определяется морфология нетканого волокнистого материала, которые влияют на комплекс эксплуатационных свойств: диффузионные, физико-механические, биомедицинские и др. Геометрия волокна в основном зависит от молекулярной массы полимера, вязкости, электропроводности и скорости истечения раствора (производительность). Как показали наши исследования, диаметр волокна практически не зависит от производительности процесса электроформования при различных концентрациях ПГБ в растворе. При увеличении молекулярной массы ПГБ наблюдается рост диаметра волокна. Это вполне закономерен и объясняется увеличением числа межмолекулярных зацеплений в полимерном растворе, которые препятствуют вытягиванию струи в процессе электроформования. Было установлено, что низкая электропроводность раствора ПГБ препятствует образованию однородных по толщине волокон. С ростом электропроводности средний диаметр снижается до определенного значения, а затем имеется тенденция к некоторому росту. Этот рост определяется увеличением вязкости раствора из-за высокой концентрации электролита.

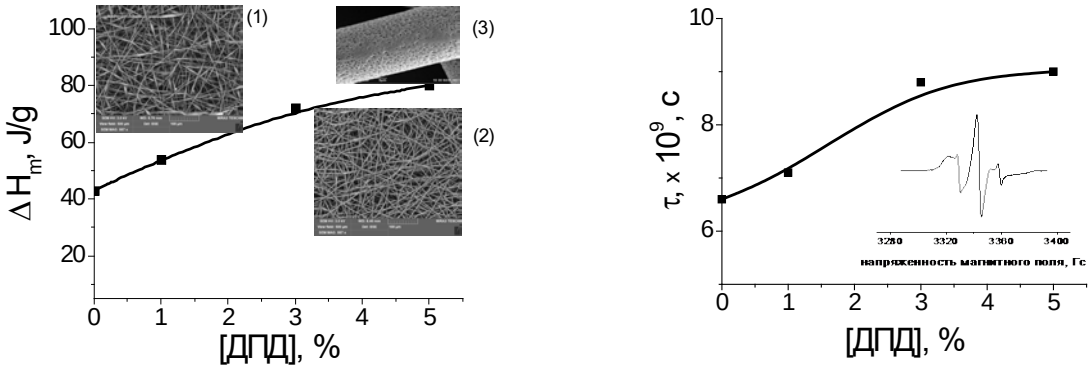
Поскольку исследуемые волокнистые материалы рекомендованы для использования в медицине в качестве матриц пролонгированной доставки лекарственных веществ, антисептиков, тканевой инженерии, далее мы рассмотрим влияние этих веществ на структуру волокон. Для модельного эксперимента мы выбрали вещества с концевыми гидроксильными группами и комплекс, содержащий хлорид металла. Следует ожидать межмолекулярного взаимодействия этих компонентов с полярными группами ПГБ в процессе формирования волокна. Наличие в химическом соединении (лекарственном веществе, биологически активном веществе, антисептике) полярных функциональных групп или комплексов с металлом должно влиять не только на технологические характеристики формовочного раствора, но и на процессы структурообразования волокна. В качестве иллюстрации мы выбрали два разных вещества – дипиидамол (ДПД), содержащий концевые ОН – группы и комплекс железо (III) хлор террафенилпорфирин (Fe(III)ClТФП), содержащий хлорид железа (III) в составе комплекса. На рис. 1 приведены структурные формулы этих соединений. На рисунке 2а показано, что с ростом концентрации ДПД геометрия волокон меняется от переходной (цилиндры-капли) до ровной цилиндрической. При этом сами волокна имеют пористую структуру. Средний диаметр волокна составляет 2–5 мкм, а размер пор колеблется в диапазоне 0,05–0,2 мкм.



(а) (б)

Рисунок 1 – Структурные формулы ДПД (а) и комплекса Fe(III)ClТФП (б).

Надмолекулярная структура волокон ПГБ изменяется с ростом концентрации ДПД. На рис. 2 (а) приведена зависимость энтальпии плавления волокон от концентрации ДПД (метод ДСК). С увеличением содержания ДПД наблюдается рост энтальпии плавления ПГБ, что свидетельствует о росте степени кристалличности. Частицы ДПД являются эффективными зародышами кристаллизации. При этом средний размер кристаллитов практически не изменяется, на что указывает неизменность температуры плавления (168–169° С) от концентрации ДПД.



(а) (б)

Рисунок 2 – Зависимость энтальпии плавления (а) и времени корреляции волокон ПГБ (б) от концентрации ДПД. На вставке приведен спектр ЭПР радикала ТЕМПО в волокнах ПГБ-ДПД. Микрофотографии волокнистых материалов состава: исходный ПГБ (1), ПГБ + 5 % ДПД (2), моноволокно (3). (СЭМ).

Анализ аморфной фазы волокон методом ЭПР с использованием зонда (ТЕМПО) (вставка на рис. 2 б) показал наличие суперпозицию спектров скоростей вращения зонда, показывающих неравновесность структуры аморфной фазы в волокнах: наличие областей с различной плотностью упаковки сегментов макромолекул. Зависимость среднего времени корреляции от концентрации ДПД представлена на рис. 2б. Видно, что с ростом концентрации ДПД время корреляции растет. Это позволяет нам утверждать об уплотнении аморфной фазы в волокнах.

Для сравнения была исследована структура гетерогенных ультраволокнистых матриц на основе ПГБ и металлокомплексом Fe(III)ClТФП, проявляющим антибактериальные свойства. Это соединение является производным хлорофилла и обладают высоким антибактериальным эффектом за счет специфической реакции с кислородом. Как и в случае с ДПД, добавление 1–5 масс.% Fe(III)ClТФП улучшает качество формовочного раствора, что приводит к формированию ровных волокон со средним диаметром 2–4 мкм. Учитывая сильную полярность данного комплекса, следует ожидать его активного взаимодействия с кислород – содержащими группами ПГБ при формировании волокон. В табл. 2 приведены результаты исследования волокон методом ДСК.

Таблица 2. Характеристики кристаллической фазы волокон ПГБ с комплексом Fe(III)ClТФП (ДСК)

Содержание FeClТФП, %	нагрев		охлаждение	
	$\chi_{пл}$, %	$T_{пл}$ °C (±1°)	$\chi_{кр}$, %	$T_{кр}$ °C (±1°)
0	55	175	68	94
1	56	170	45	68
3	68	169	59	89
5	85	169	58	76
(χ) – степень кристалличности; температура плавления (**$T_{пл}$**) и кристаллизации ($T_{кр}$)				

Из табл. 2 следует, что с ростом концентрации комплекса растет степень кристалличности ПГБ. В данном случае мы имеет типичный механизм зародышеобразования кристаллической фазы, как и в случае с ДПД. При охлаждении материала заметно торможение кристаллизационных процессов в ПГБ, что связано с сильным межмолекулярным взаимодействием.

При изучении кристаллической структуры волокон методом РСА было установлено, что с ростом концентрации Fe(III)ClТФП растут продольный размер кристаллитов и большой период кристаллической фазы ПГБ, что согласуется с общим ростом степени кристалличности, измеренной методом ДСК (рис. 3, табл. 2). Это хорошо согласуется с закономерностями, полученными ранее при добавлении ДПД. При изучении волокон зондовым методом ЭПР мы также как и в случае волокон с ДПД, получили сложные спектры, состоящие из медленной и быстрой компонент (вставка на рис. 4). Введение Fe(III)ClТФП в ПГБ приводит к уплотнению аморфной фазы полимера при формировании волокна на что указывает монотонное увеличение времени корреляции зонда (рис. 4).

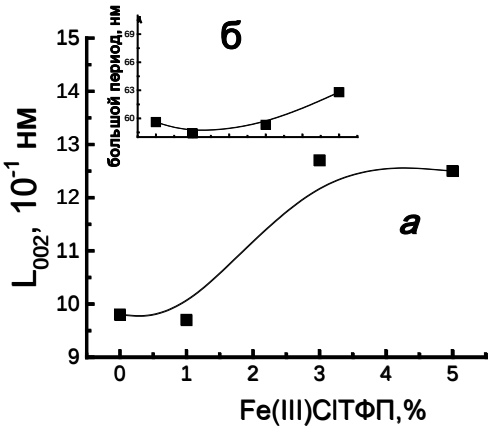


Рисунок 3 – Зависимость продольного размера кристаллитов (а) и большого периода (б) ПГБ от содержания Fe(III)ClТФП.

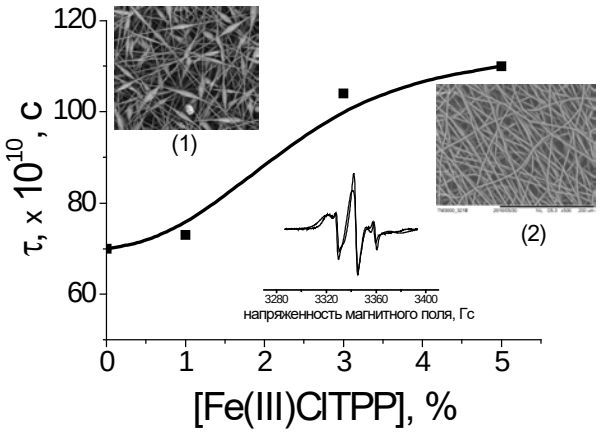


Рисунок 4 – Зависимость времени корреляции (τ) в волокнах ПГБ – Fe(III)ClТФП от состава. На вставке спектр ЭПР радикала ТЕМПО в волокнах ПГБ – Fe(III)ClТФП (3 %). Нетканые волокнистые материалы ПГБ (1), ПГБ – Fe(III)ClТФП(3 %) (2). (СЭМ)

Доля плотных областей при увеличении концентрации Fe(III)ClТФП возрастает. По-видимому, неравновесность волокна обуславливается большим количеством мезаморфных структур (недостроенных кристаллитов), образование которых происходит в результате межмолекулярных взаимодействий полярных групп ПГБ с сильно полярными комплексами Fe(III)ClТФП, тормозящими процесс кристаллизации.

Заключение

В данной научно-исследовательской работе проведены фундаментальные исследования структурной организации гетерогенных фибриллярных матриц на основе поли-3-гидроксибутирата, содержащих полярные низкомолекулярные вещества: ДПД и $FeCl_3$ ТФП. Продемонстрирована определяющая роль полярности растворимого низкомолекулярного вещества на формирование надмолекулярной структуры волокон ПГБ. Сделан вывод о том, что межмолекулярное взаимодействие приводит к совершенствованию кристаллической структуры ПГБ, не зависимо от химической природы низкомолекулярного компонента в структуре волокна. Также было определено, что характеристики полимерного раствора в значительной степени определяют геометрию и морфологию ультратонких волокон ПГБ. Введение в ПГБ волокна металлокомплексов тетрафенилпорфирина и ДПД приводит к существенному изменению геометрии и морфологии полимерных волокон. Рассмотренные в исследовании полимерные волокнистые материалы могут быть успешно использованы для создания матриц контролируемого высвобождения лекарственных препаратов, скаффолдов для тканевой инжерении, экосорбентов.

Литература

1. Al-Abduljabbar A., Farooq I. Electrospun Polymer Nanofibers: Processing, Properties, and Applications. Polymers 2023, 15, 65. https://doi.org/10.3390/polym15010065

2. Schiffman J.D., Schauer C.L. A review electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications // Polymer Reviews. 2008. V. 48. № 2. P. 317.

3. Okutan N., Terzi P., Altay F. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers // Food Hydrocolloids. 2014. V. 39. P. 19–26. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.022.

4. Yang B., Wang L., Zhang M., Luo J., Lu, Z., Ding, X. Fabrication, applications, and prospects of aramid nanofiber // Adv. Funct. Mater. 2020. V. 30. P. 2000186. https://doi.org/10.1002/adfm.202000186

5. Hisano T., Kasuya K., Tezuka Y., Ishii N., Kobayashi T., Shiraki M., Oroudjev E., Hansma H., Iwata T., Doi Y., Saito T., Miki K. The Crystal Structure of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from Penicillium funiculosum Provides Insights into the Recognition and Degradation of Biopolyesters // Journal of Molecular Biology. 2006. V. 356. Iss. 4. P. 993–1004. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.028

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-26

УДК 640

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛОВ

И.А. Буторова[1], Л.С. Донская[1], Д.А. Матвеева[1], Е.С. Олейник[2], К.И. Киенская[1]

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, г. Москва, Россия
МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), г. Москва, Россия

Одним из перспективных направлений в разработке новых антибиотиков является синтез производных соединений с известными антимикробными свойствами. Рибавирин известен как эффективное противовирусное средство. В последнее время в литературе встречаются данные о его противобактериальной и антигрибковой активности, которая обусловлена присутствием в его составе 1,2,4-триазольного фрагмента. Представляет интерес изучение антимикробной активности синтезированных аналогов гетероциклического основания рибавирина. Была изучена антигрибковая активность синтезированных аналогов гетероциклического основания рибавирина в отношении тест-штамма условно патогенных дрожжей *Candida albicans* ВКПМ-Y-3108. Оценку антигрибковой активности проводили турбидиметрическим методом по степени задержки роста тест-штамма в жидкой питательной среде Сабуро в присутствии исследуемых соединений при измерении оптической плотности выращенных образцов при 36 °С в течение 48 часов на спектрофотометре при λ 540 нм. Концентрация исследуемых веществ в питательной среде составляла 2,0 мг /мл. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица1. Оценка антигрибковой активности синтезированных аналогов гетероциклического основания рибавирина

	Образцы						
	контроль	№ 2	№ 3	№ 11	№ 24	№ 25	№ 26
Рост *C. albicans*, ед. опт. плотности	0,813 ±0,28	0,151 ± 0,23	0,290 ±0,31	0,421 ±0,25	0,743 ±0,18	0,623 ±0,34	0,742 ±0,41
Степень ингибирования, %	–	81,4	64,3	48,2	8,6	23,4	8,7
Химические названия производных		Дигидрохлорид 5-[(1S)-1-амино-3(метилтио) пропил]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид	Дигидрохлорид 5-[(1S)-1-амино-2(фенилэтил) пропил]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид	5-(тетрагидрофуран-2-ил)-1,2,4-триазол-3-амин	4-(((III-1,2,4-триазол-3-ил) амино) метил)фенол	N-(3,4-диметоксибензил)-III-1,2,4-триазол-3-амин	4-(((III-1,2,4-триазол-3-ил) амино) метил)-2-метоксифенол

Таким образом, наибольшая антигрибковая активность в отношении тест-штамма Candida albicans ВКПМ-Y-3108 была обнаружена у синтезированного аналога гетероциклического основания рибавирина: дигидрохлорид 5-[(1S)-1-амино-3(метилтио) пропил]-1,2,4-триазол-3-карбоксамида.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-27

УДК 640

НЕ-АНТИБИОТИКИ НА ОСНОВЕ РИБАВИРИНА ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

К.И. Киенская, Донская Л.С., Матвеева Д.А., Бобровницкий С.К., И.А. Буторова

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, г. Москва, Россия

Одним из перспективных направлений для решения вопросов комплексной защиты растений от различных фитопатогенов является применение не-антибиотиков – соединений, которые наряду с противовирусной активностью, обладают также противомикробным действием, одним из представителей которых является рибавирин. Изучено влияние рибавирина на почвенную микрофлору, рост фасоли и защиту ее от фитопатогенного гриба Fusariumculmorum, вызывающего фузариоз фасоли. В результате исследования было установлено, что внесение в почву рибавирина хотя несколько и снижает общее количество микроорганизмов в почве по сравнению с контролем, но увеличивает бактериальное разнообразие в ней, что свидетельствует о повышении биологической активности почвы. (табл. 1).

Таблица 1. Влияние рибавирина на микрофлору почвы.

Показатели	Общее количество микроорганизмов, КОЕ/г почвы.	
	24 часа	168 часов (7 суток)
Контрольный образец	$4{,}9\pm0{,}33\cdot10^{9}$	$1{,}54\pm0{,}25\cdot10^{10}$
Опытный образец с рибавирином	$7{,}6\pm0{,}43\cdot10^{9}$	$1{,}16\pm0{,}24\cdot10^{10}$

Полив всходов фасоли 1 раз в неделю раствором рибавирина в концентрации 0, 4 мг/мл стимулировал рост растений и увеличивал общее количество зеленной массы более, чем на 50 % по сравнению с концентрацией рибавирина в растворе, равной 0,3 (табл. 2). При этом в прикорневой зоне фасоли не был обнаруженфитопатогенный гриб Fusariumculmorum и отмечалось значительное снижение общего количества бактериальноймикрофлоры.

Таблица 2. Общее количество микроорганизмов в прикорневой зоне фасоли и общий вес выросших растений

Показатели	Концентрация рибавирина в растворе для полива, мг/мл	
	0,3	0,4
Вес зеленой массы фасоли в образцах, не зараженных фитопатогеном., г	3,0190	3,7511
Общее количество мкроорганизмов в прикорневой зоне растерий, КОЕ	$1{,}83\pm0{,}34\cdot10^{6}$	$2{,}53\pm0{,}22\cdot10^{4}$
Присутствие в прикорневой зоне фасоли фитопатогенного грбаFusariumculmorum	Рост фитопатогена обнаружен	Рост фитопатогена не обнаружен

Таким образом, применение не-антибиотикарибавирина в сельском хозяйстве представляет потенциально интересное направление.

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-28

УДК 640

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ВЫБОРУ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI K-12 И B ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ В ПРОМЫШЛЕННЫХ МАСШТАБАХ

Н.С. Плеханова[1], И.Н. Соловьева[1], А.В. Липкин[2]

[1]ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
[2] РХТУ им Д.И. Менделеева, Россия

Штаммы *Escherichia coli* линий K-12 и B являются одними из наиболее часто используемых бактерий-хозяев для получения рекомбинантных белков в промышленных масштабах. Тем не менее, выбор *E. coli* в качестве штамма-хозяина может иметь некоторые недостатки, такие как накопление ацетата. Ацетат накапливается в некоторых условиях культивирования, сопровождается снижением биомассы и продукции целевого рекомбинантного белка, энзиматическая активность которого во многих случаях связана с посттрансляционными модификациями, в частности, с процессом ацетилирования его лизиновых остатков.

Так, например, показатели удельной активности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАФД) – фермента центрального пути метаболизма в двух широко используемых штаммах *E. coli* линий K-12 и B значительно различаются. При полной идентичности аминокислотных последовательностей белков в обоих штаммах, показатель удельной активности белкового препарата ГАФД в штамме MG1655 линии K-12 на 35 % превышает удельную активность того же белка в штамме линии B.

Результаты углубленного изучения литературных данных по анализу транскриптома и протеома исследуемых штаммов показали, что транспорт глюкозы у штаммов линии K-12 более эффективен, чем у штаммов линии B. А также было показано, что уровни экспрессии генов, участвующих в метаболизме ацетата и генов глиоксилатного шунта в штамме BL21 (DE3) выше, чем в штаммах линии K12. Все это безусловно может влиять на показатели активности ферментов.

Таким образом, выбор штамма-хозяина является существенным фактором для эффективного получения рекомбинантных белков, а изучение ферментов центрального метаболизма и их регуляции имеет важное значение для оптимизации производства.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-29-31
№2, 2023

УДК 579.61

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОЗОЛЯ ГИДРОКСИДА ГАДОЛИНИЯ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ, ОСНОВАННЫМ НА СОДЕРЖАНИИ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА В СРЕДЕ

В.С. Макулова, Л.О. Шадская, И.А. Буторова, И.А. Белова, А.С. Гродский

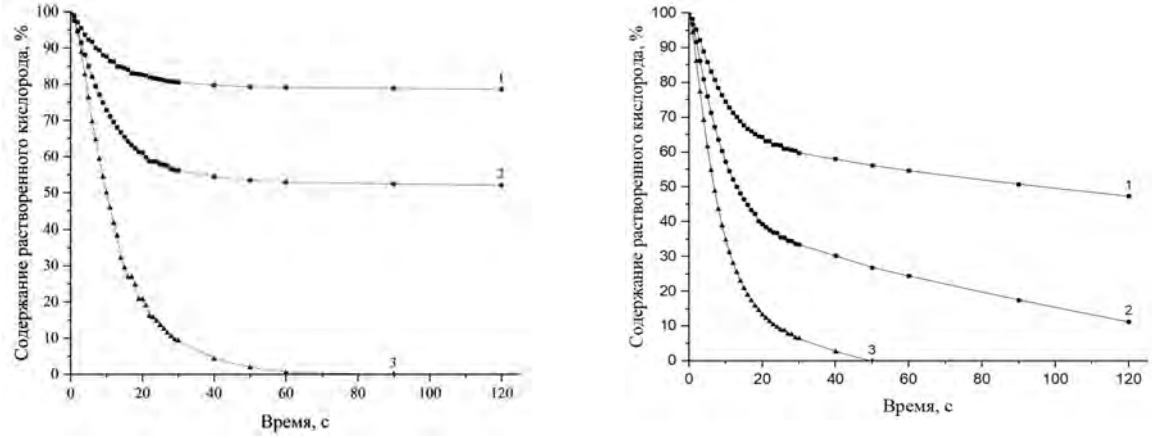
ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия

В последнее время растет устойчивость микроорганизмов к известным антимикробным препаратам, а также расширяется спектр устойчивых видов, поэтому возникает потребность в разработке новых биоцидных веществ, а также методов оценки их антимикробной активности. Большой интерес представляют экспресс-методы, так как они позволяют быстро провести оценку и отбросить неудачные варианты. Известно, что наночастицы многих металлов и их соединений, в том числе редкоземельных элементов, обладают антимикробными свойствами, зачастую отсутствующими в их макроразмерной форме. Одними из наиболее перспективных для применения в медицинских целях среди соединений редкоземельных элементов являются соединения гадолиния. В связи с этим целью данной работы являлась разработка экспресс-метода определения антимикробной активности веществ на основе содержания растворенного кислорода в среде и определение антимикробной активности гидрозоля гидроксида гадолиния данным методом. Синтез и основные коллоидно-химические характеристики гидрозоля гидроксида гадолиния описаны в работе [1].

Для разработки экспресс-метода использовался многопараметровый настольный анализатор HI2020 edge (Hanna Instruments) с подключенным датчиком растворенного кислорода III 764080, который представляет собой ультратонкий полярографический электрод с ячейкой Кларка, разработанный для измерения растворенного кислорода в водных растворах.

В качестве тест-микроорганизмов при разработке метода были выбраны следующие штаммы: Micrococcus luteus ВКПМ-В-7845, Saccharomyces cerevisiae ВКПМ-Y-752, Pseudomonas fluorescens ВКПМ-В-6735, Aspergillus niger ВКПМ-F-1057, Ochrobactrum ciceri ВСБ-947 и Rhodococcus erythropolis ВСБ-388. На первом этапе были проведены исследования для определения условий подготовки культуры тест-микроорганизмов. С этой целью варьировали плотность посевного материала, приготовленного по шкале МакФарланда, и время предварительного культивирования. В качестве примера на рисунке 1 представлены кривые кинетики потребления растворенного кислорода в среде при добавлении 1 мл инокулята M. luteus и S. cerevisiae с плотностью 0,5, 5 и 10 по МакФарланду к 100 мл жидкой питательной среды.

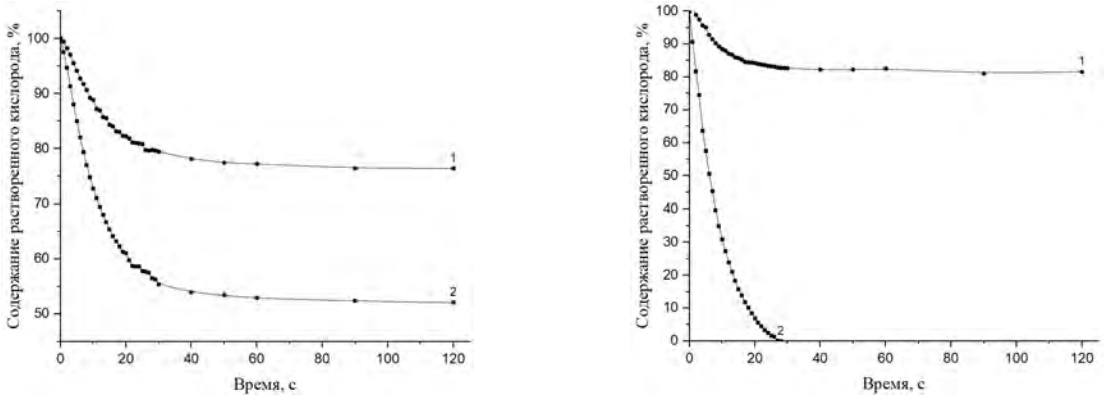
На рисунке 2 представлены кривые при варьировании времени предварительного культивирования от 3 до 24 часов для различных культур при плотности инокулята 5 по стандарту МакФарланда.



(а) (б)

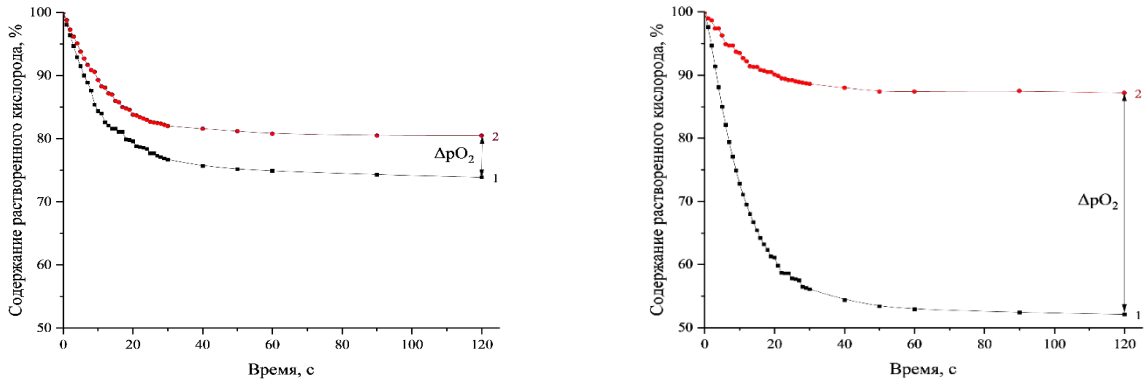
Рисунок 1. Кинетика потребления кислорода M. luteus при времени предварительного культивирования 5 часов (а) и S. cerevisiae (б) при времени предварительного культивирования 24 часа, плотность инокулята соответствует: 1 – 0,5 по МакФарланду, 2 – 5 по МакФарланду, 3 – 10 по МакФарланду

Исходя из анализа совокупности полученных данных были определены условия подготовки тест-культур: плотность посевного материала – 5 по МакФарланду, время предварительного культивирования – 3–5 часов для бактерий, 24 часа для грибковых и дрожжевых культур.



(а) (б)

Рисунок 2. Кинетика потребления кислорода M. luteus (а) и A. niger (б) при плотности посевного материала, соответствующего стандарту 5 по МакФарланду, время предварительного культивирования: 1 – 3 ч, 2 – 5 ч для M. luteus и 24 ч для A. niger.



(а) (б)

Рисунок 3. Кинетика потребления кислорода P. fluorescens (а) и M. luteus (б) при времени культивирования 5 ч и плотности инокулята 5 по стандарту МакФарланда: 1 – контрольный образец, 2 – опытный образец с добавлением ПАВ.

Возможность использования прибора для оценки антимикробной активности проверяли при добавлении в среду ПАВ с установленной активностью против широкого спектра микроорганизмов – тетрабутиламмония бромистого с концентрацией 0,5 масс %. В качестве критерия оценки антимикробной активности в отношении каждой исследуемой культуры определяли величину ΔpO_2, которая представляет собой разницу между содержанием растворенного в среде кислорода в опытном и контрольном образцах за 2 мин. Чем больше данная величина, тем больше антимикробная активность в отношении взятой культуры. На рисунке 3 в качестве примера представлены кривые кинетики потребления кислорода для *P. fluorescens* и *M. luteus*. Результаты определения ΔpO_2 для всех выбранных тест-штаммов представлены в таблице 1.

Из полученных данных видно, что данный метод можно использовать для оценки антимикробной активности веществ и принять в качестве экспресс-метода для бактериальных культур.

Для определения антимикробной активности гидрозоля гидроксида гадолиния разработанным экспресс-методом были выбраны следующие микроорганизмы: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Candida albicans* ВКПМ Y-3108 и *Bacillus subtilis* ВКПМ B-13183. В качестве ингибитора жизнедеятельности микроорганизмов в опытные образцы было добавлено 5 мл гидрозоля с концентрацией 52 г./л. Кривые кинетики потребления кислорода представлены на рисунке 4, рассчитанные величины ΔpO_2 – в таблице 2.

Таблица 1 – Величины ΔpO_2, полученные при использовании в качестве ингибитора тетрабутиламмония бромистого

Тест-микроорганизм	fluorescens	luteus	cerevisiae	niger	ciceri	erythropolis
ΔpO_2, %	6,6	35,1	27,2	3,8	7,6	3,1

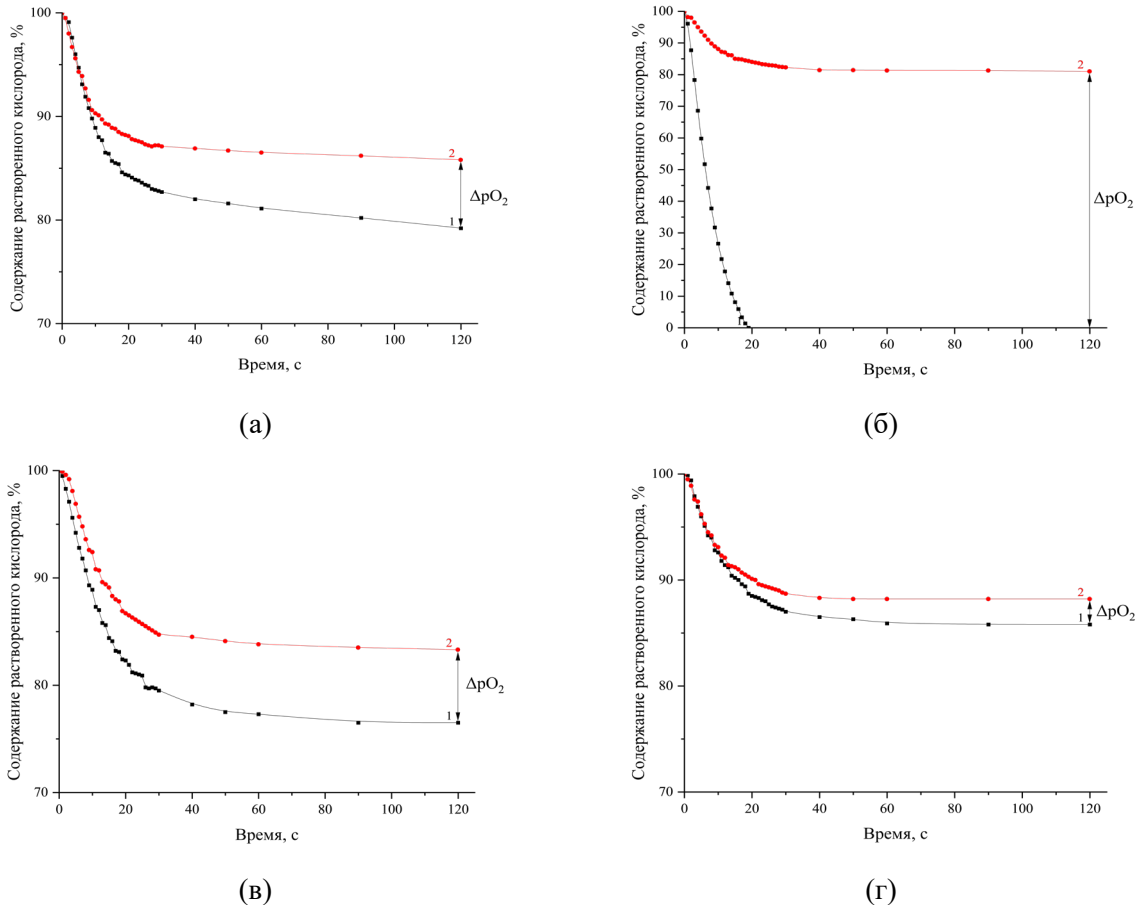


Рисунок 4. Кинетика потребления кислорода *E. coli* (а), S. aureus (б), B. subtilis (в), C. albicans (г) при времени культивирования 3 часа и плотности инокулята 5 по стандарту МакФарланда: 1 – контрольный образец, 2 – опытный образец с добавлением гидрозоля гидроксида гадолиния

Таблица 2 – Величины ΔpO_2, полученные при использовании в качестве ингибитора гидрозоля гидроксида гадолиния

Тест-микроорганизм	coli	aureus	subtilis	albicans
ΔpO_2, %	6,6	81	64,2	3,5

Как видно из представленных данных, антимикробная активность гидрозоля гидроксида гадолиния, определенная данным экспресс-методом, была обнаружена в отношении всех исследуемых тест-культур и согласуется с ранее полученным результатами определения антимикробной активности золя классическим методом серийных разведений [2].

Литература

1. Макулова В.С., Гродский А.С., Белова И.А. Электролитная коагуляция гидрозолей гидроксида гадолиния и ее механизмы // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2022. № 3. С. 20–27.

2. Макулова В.С. и др. Антимикробная активность гидрозоля гидроксида гадолиния // Актуальная биотехнология: Материалы X международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». 2022. № 1. С. 102–103. (Алушта, 12–16 сентября 2022 г.)

№2, 2023 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-32

УДК 637.068

К ВОПРОСУ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ФАЛЬСИФИКАЦИИ КОЗЬЕГО МОЛОКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

А.В. Хан, О.Ю. Фоменко

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия

Фальсификация молока является одной из основных глобальных проблем, поскольку из-за своей высокой пищевой ценности оно в больших количествах потребляется во всех частях мира. Разрыв между производством молока и спросом на него приводит к возникновению недобросовестной практики по фальсификации продукции [1]. Одним из методом определения подлинности молока является ПЦР. Высокая специфичность, чувствительность, быстрота и относительная простота выполнения ПЦР-анализа позволяют успешно использовать его как для контроля микробиологических показателей входного сырья и готовой продукции, так и для оценки видовой составляющей продуктов питания [2].

Использование прямой ПЦР даёт ряд дополнительных преимуществ, важнейшим из которых является увеличение количества доступной для амплификации ДНК-матрицы, потери которой в ходе традиционных процессов выделения и очистки могут достигать 83 % [3]. Образцы коровьего и козьего молока, приобретённые на локальном продовольственном рынке, использовали для приготовления модельных смесей, имитировавших различную степень фальсификации конечной продукции. Объёмная доля примеси коровьего молока варьировала от 0,1 до 99,9 %. Определение пригодности применения метода прямой ПЦР для выявления фальсификации молока проводили с использованием набора реагентов «2,5X Mas HFBL MIX-3510» (ЗАО «Диалат Лтд», Россия). В качестве источника ДНК в реакционную смесь общим объёмом 25 мкл вносили по 2 мкл модельных смесей молока. Амплификацию фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы I B. taurus осуществляли с использованием пары праймеров Bos-F6 (5’-CATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATAAAG-3’) и Uni-R (5’-CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA-3’), ранее использованные для идентификации видовой принадлежности мясной продукции [4]. Программа амплификации состояла из начальной денатурации при 98 °C в течение 5 мин, 35 циклов вида 98 °C – 10 сек, 64 °C – 30 сек, 72 °C – 20 сек, и финальной элонгации при 72 °C в течение 10 минут.

В ходе выполнения работы было установлено, что применение метода прямой ПЦР позволяет успешно амплифицировать фрагмент митохондриальной ДНК B. taurus размером в 311 пар оснований. Использование неочищенных биологических образцов (молока) в объёме 8 % от реакционной смеси, не вызывало ингибирования полимеразной цепной реакции. Получение в результате протекания ПЦР ампликона с длиной 311 пар оснований позволяет с уверенностью судить о наличии примеси коровьего молока в анализируемом образце. Учёт результатов ПЦР путём электрофореза в 2 % агарозном геле показал, что нижняя граница обнаружения подмеса коровьего молока составляет 0,1 % от объёма смеси (рис. 1).

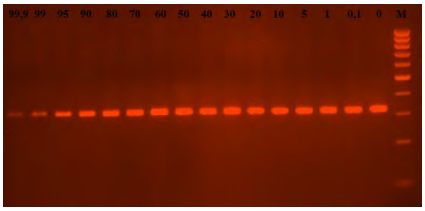


Рис. 1. Результаты прямой ПЦР для определения подлинности сырого козьего молока (99,9–0 – объёмная доля козьего молока в смеси, %; M – маркер длин ДНК «100+ bp DNA Ladder»)

Таким образом, прямая ПЦР с амплификацией видоспецифических фрагментов митохондриальной ДНК представляет собой перспективный метод выявления фальсификации козьего молока молоком крупного рогатого скота, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью.

Литература

1. R. Nagraik, A. Sharma, D. Kumar, P. Chawla, A.P. Kumar. Milk adulterant detection: Conventional and biosensor based approaches: A review // Sensing and Bio-Sensing Research. – 2021. – Vol. 33. – 100433. DOI: 10.1016/j.sbsr.2021.100433.

2. Е.А. Юрова, Н.А. Жижин, С.А. Фильчакова. Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции // Вестник МГТУ. – 2020. – Т. 23, № 3. – С. 214–223. DOI: 10.21443/1560-9278-2020-23-3-214-223.

3. Martin B, Linacre A. Direct PCR: A review of use and limitations // Sci Justice. – 2020. – Vol. 60(4). – P. 303–310. DOI: 10.1016/j.scijus.2020.04.003.

4. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products // Food Chem. – 2014. – V. 163. – P. 77–82. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.062.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-33-34

УДК 577.2

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА В ДРОЖЖАХ SACCHAROMYCES BOULARDII

Е.А. Белаш, Д.Н. Щербаков, Е.А. Колосова, Д.В. Балабова

ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия

Человеческий ангиогенин является белком, участвующим в ангиогенезе. Ангиогенин – востребован как препарат, который способствует заживлению ран, трофических язв, ожогов, лечению инфарктов, церебральных тромбозов и других заболеваний, связанный с нарушением васкуляризации. Потенциальной областью применения ангиогенина может быть терапия и диагностика ряда заболеваний, в том числе онкологических и нейродегенеративных [1].

Рекомбинантный ангиогенин ранее был получен при помощи продуцентов на основе Escherichia coli[2], дрожжей Pichia pastoris[3], и клеток млекопитающих BHK[4]. Также описан способ получения натурального ангиогенина из молока [5]. Получение ангиогенина при помощи каждого из рассматриваемых подходов не лишено недостатков, поэтому разработка новых штаммов-продуцентов является актуальным направлением. Пробиотические дрожжи Saccharomyces boulardii являются перспективной платформой для получения рекомбинантных белков, поскольку признаны безопасными и имеют статус GRAS, а также широко используются для лечения различных заболеваний кишечника и улучшения пищеварения. Безопасность, полностью секвенированный геном, оптимальный рост при 37 °C, устойчивость к кислымрН, способность к секреции и фолдингу эукариотических белков, делают дрожжи S. boulardii удобной системой экспрессии гетерологичных рекомбинантных белков. В настоящее время описано множество генетических инструментов, промоторов, маркеров отбора и потенциальных сайтов интеграции которые позволяют получать рекомбинантные белки в S. boulardii[6].

Целью нашей работы была разработка интеграционного вектора для получения рекомбинантного ангиогенина человека в дрожжах S. boulardii. На первом этапе был проведен дизайн вектора GH-TEF-Bul-Ang (рис. 1), позволяющий интегрировать экспрессионную кассету, содержащую ген ангиогенина человека, в дрожжевой геном по принципу гомологичной рекомбинации.

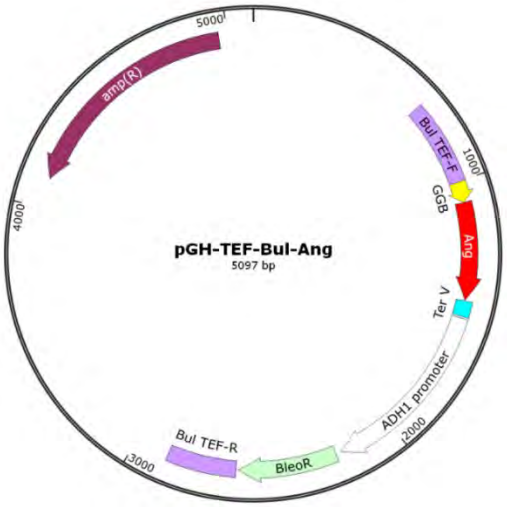


Рис. 1 – Генетическая карта плазмиды pGH-TEF-Bul-Ang

При разработке вектора было решено использовать сильный конститутивный промотор фактора элонгации трансляции (TEF), под контролем которого находится экспрессия ангиогенина человека (Ang). В состав кассеты также были включены: сигнальный пептид GGB, обеспечивающий секрецию белка во внеклеточное пространство; терминаторная последовательность TerV; промотор гена алкогольдегидрогеназы (ADH1 promoter) и ген устойчивости к зеоцину (BleoR) как селективный маркер.

С использованием олигонуклеотидных праймеров были получены ампликоны экспрессионной кассеты: промотор гена алкогольдегидрогеназы и гена устойчивости к зеоцину (рис. 1, 1512…2613), ген рекомбинантного ангиогенина человека с промоторной и терминаторной частью (рис. 1, 282…1518). Очищенные ПЦР-продукты клонировали в составе вектора pJET, нуклеотидный состав определяли секвенированием по Сенгеру.

Полученные векторы обрабатывали эндонуклеазами рестрикции FriOI, AspA2I, CciNI. Продукты реакций гидролиза лигировали. Лигазной смесью проводили химическую трансформацию компетентных клеток Escherichia coli Stbl3, которые высевали на селективную питательную среду, содержащую ампициллин. Полученный вектор секвенировали по методу Сенгера. В результате был получен вектор pGH-TEF-Bul-Ang.

Плазмиду pGH-TEF-Bul-Ang обрабатывали ферментом ZrmI и 1–2 мкг полученной ДНК трансформировали электрокомпетентные клетки S. boulardii. Была проведена электропорация клеток ранней логарифмической фазы при следующих параметрах: 2500 В, 25 мкФ и продолжительности импульсов 4,6 мс. Трансформанты отбирали на среде YPD, содержащей антибиотик зеоцин в концентрации 0,0064 мг/мл. Наличие встройки экспрессионных кассет подтверждали методом ПЦР с колонии (рис. 2).

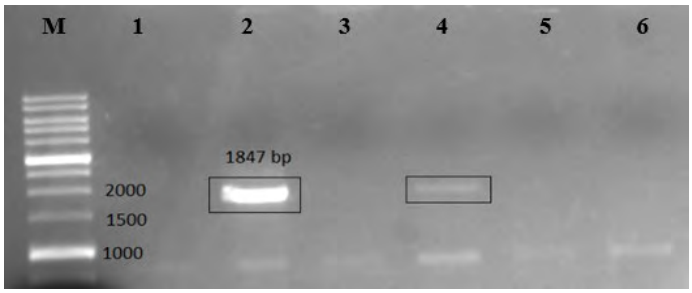


Рис. 2 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов в агарозном геле: М – маркеры молекулярных масс, 1–6 – номер индивидуальных колоний после электропорации

Из шести клонов, положительный результат был получен для второго и четвертого клона. Второй клон был протестирован на способность секретировать ангиогенин в культуральную среду. Для этого клетки переносили в 25 мл среды YPD, содержащей 2 % глюкозы, культивирование проводили при 37 °С и 200 об/мин в течение 144 часов. Отбор образцов культуральной жидкости проводили каждые 24 часа. Полученные аликвоты центрифугировали при 3000g 10 минут. Наличие целевого белка в образцах подтверждали методом белкового электрофореза в 15 %-ном ДСН-ПААГ по Лэммли, визуализацию гелей проводили окрашиванием кумасси.

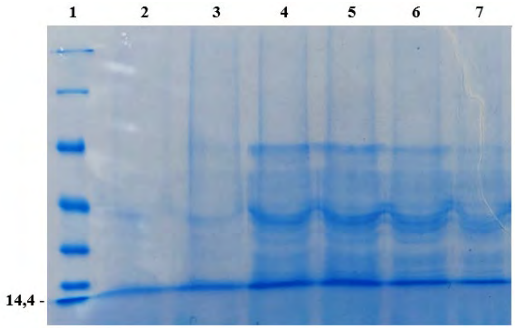


Рис. 3 – Электрофореграмма разделения белковых препаратов в ПААГ: 1 – маркеры молекулярных масс, 2–7 – продолжительность культивирования 24, 48, 72, 96, 120 и 144 часа соответственно

Полоса, соответствующая ангиогенину с ожидаемой молекулярной массой около 14 кДа, наблюдалась уже через 24 часа культивирования (рис. 3). Через 72–96 часа отмечали максимальный уровень синтеза. Таким образом, нами был сконструирован интеграционный плазмидный вектор, которым электропорировали компетентные клетки S. boulardii. В результате был получен продуцент рекомбинантного ангиогенина человека. Наличие целевого белка подтверждали методом белкового электрофореза. В дальнейшей работе запланирована очистка рекомбинантного ангигенина человека, оценка иммуноспецифичности синтезируемого белка с использованием антител и оценка его специфической активности на хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона.

Работа поддержана средствами программы развития ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» «Приоритет-2030».

Литература

1. Sheng J., Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective // Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015. – Vol.48. – P.399–410.
2. Shapiro R., Harper J.W., Fox E.A., Jansen H.W., Hein F., Uhlmann E. Expression of Met-(-1) angiogenin in Escherichia coli: conversion to the authentic less than Glu-1 protein // Anal Biochem, 1988. – Vol.175. – P.450–461.
3. Xia W.R., Fu W.L, Cai L. Expression, purification and characterization of recombinant human angiogenin in Pichiapastoris // Biosci Biotechnol Biochem, 2012. – Vol.76. – P.1384–1388.
4. Kurachi K., Rybak S.M., Fett J.W. Expression of human angiogenin in cultured baby hamster kidney cells // Biochemistry, 1988. Vol.27. – P.6557–6562.
5. Fedorova T.V., Komolova G.S., Rabinovich M.L., Tikhomirova N.A., Shalygina A.M. Milk ultrafiltrate as a promising source of angiogenin // Prikl Biokhim Mikrobiol, 2002. – Vol.38. – P.221–224.
6. Douradinha B., Reis V.C., Rogers M.B., Torres F.A., Evans J.D., Marques E.T. Jr. Novel insights in genetic transformation of the probiotic yeast Saccharomyces boulardii. Bioengineered, 2014. – Vol.5. – P.21–29.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-35-38

УДК 615.46

ФОРМИРОВАНИЕ ПОРИСТЫХ БИОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ: ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И АЛЬГИНАТА НАТРИЯ С АНТИОКСИДАНТАМИ В УСЛОВИЯХ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ДИСПЕРГИРОВАНИЯ И МИКРОВОЛНОВОГО НАГРЕВА

М.А. Яковлева[1], В.Н. Горшенев[1], А.Е. Донцов[1], Н.Л. Ароштам, Е.Л. Кучеренко[2], А.А. Ольхов[1,3]

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия
Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия
ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», Москва, Россия

Полимерные матрицы с антиоксидантами, лекарственными формами могут состоять из смеси синтетических и природных биоразлагаемых полимеров с гидрофобными и гидрофильными свойствами, с различными прочностными характеристиками и биоразлагаемыми свойтвами. Комбинацией таких смесей можно изменять соотношение гидрофильных и гидрофобных участков в композициях, регулировать прочностные и биоразлагаемые свойства композитов. В работах [1–3] рассматриваются эффекты дозированного воздействия биологически активных веществ на протекание процессов в биологических объектах на различных уровнях организации живых систем. Перспективы применений биокомпозитов, содержащих антиоксиданты, связаны как с их созданием, так и с их активным действием на область заболевания. Создание биокомпозитов на основе биоразлагаемых полимеров с лекарственными формами, антиоксидантами позволяет осуществлять их дозированное, пролонгированное выделение при деструкции полимерной матрицы. В зависимости от физико-химических свойств биологически активных веществ (БАВ), особенностей механизма действия и области поступления в организм, доза биологической активности химических соединений может быть индифферентной для организма или проявлять свойство лекарства или яда. Применению в медицине антиоксидантов, выделяемых из лекарственных растений, а также других природных соединений для лечения различных заболеваний, посвящены многочисленные международные конференции, число которых в последнее время увеличивается в связи с активным применением природных антиоксидантов. Поэтому создание и изучение различных полимерных форм доставки антиоксидантов является актуальным направлением исследований.

В качестве природных антиоксидантов применяли оммохромы различного происхождения: выделенные из голов бабочки «Бражник табачный» и мухи «Черная львинка» [4]. На первом этапе работы осуществляли выделение биоактивных компонента оммохрома из голов насекомых. Муха «черная львинка» (Hermetiaillucens, семейство Strationyidae) и ее личинки широко используются для питания сельскохозяйственных животных и конвертации биологических отходов в доступный источник пищевого белка, жиров, хитина и меланина. Чистая культура этих мух содержится в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцева (ИПЭЭ РАН). Технология культивирования мух включает следующие стадии: содержание взрослых мух в инсектарии в контролируемых условиях; инкубация яиц и получение личинок в инкубаторе; выращивание личинок в контейнере с питательным субстратом; получение предкуколок, затем куколок и имаго. Взрослые мухи живут 5–8 дней. Нуклеотидная последовательность Hermetiaillucens зарегистрирована в Генном банке (Hermetiaillucens, sample H-il 1 No. KY817115). После окончания жизненного цикла подмор мух замораживали и хранили при температуре –180 °С. Бабочка табачный бражник (Manducasexta, семейство Sphingidae). Гусеницы этой бабочки служат популярным кормом для насекомоядных экзотических животных. Культура содержится в энтомологическом отделе Московского зоопарка.

Экстракция оммохромов из голов насекомых была выполнена без их предварительной гомогенизации. Головы взрослых умерших насекомых были отделены вручную и хранились при температуре -180 °С. При необходимости головы насекомых были предварительно проинкубированы в нейтральном метаноле в соотношении ~ 10 г. голов на 300 мл метанола в течение суток (в темноте), при комнатной температуре и периодическом перемешивании. После фильтрации 500 мл абсолютного метанола, содержащего 1 % по объему хлористого водорода (MeOH-HCl смесь), были добавлены к массе голов и смесь инкубировали при 6 °С в темноте, в течение 48 ч при периодическом встряхивании. После этого экстракт фильтровали через бумажный фильтр (Ватман, Grade 6).

Полученный супернатант вишневого цвета нейтрализовали 20 %-ным раствором аммиака и центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин. Супернатант удаляли, к осадку добавляли свежий раствор MeOH-HCl до его полного растворения. Процедуру осаждения оммохромов раствором аммиака повторяли дважды. Окончательно осадок оммохромов высушивали в эксикаторе в темноте в присутствии безводного хлорида кальция.

На втором этапе работы проводили оценку антиоксидантной активности биоактивных компонентов. Антирадикальную активность полученных оммохромов определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемилюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [5]. В качестве измеряемых параметров был взят латентный период достижения максимальной интенсивности свечения. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu» RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре. Для количественной оценки способности оммохромов взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе данной модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах зависимости латентного периода от концентрации пигмента. Среда для инкубации содержала 0,05 М К-фосфатный буфер, pH 7,4, 2,0 мкМ гемоглобина, 100 мкМлюминола, 100 мкМ ЭДТА, и различные концентрации биоактивных компонентов в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,4 или в растворе метанол-HCl. Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода. В качестве контроля использовали буферный раствор без добавления биоактивных компонентов.

На третьем этапе работы проводили изготовление биокомпозитов с применением биоразлагаемых полимеров и антиоксидантов в условиях ультразвукового диспергирования и микроволнового нагрева. Изготовление композитов на основе биоразлагаемых полимеров: поли-3-гидроксибутирата (немецкой фирмы "Biomer") – (ПГБ), поликапролактона (ПКЛ) (Shenzen Bright China Ind.) и природных антиоксидантов проводили путем смешения 7–10 % растворов полимеров в хлороформе с растворами природных антиоксидантов. В качестве дополнительного полимерного компонента использовали 3 % водный раствор альгината натрия.

В работе применяли две схемы смешения термодинамически не совместимых компонентов.

По первой схеме после ультразвукового диспергирования (УЗДН-А) в течение 1–3 минут смесь подвергалась микроволновому нагреву в СВЧ-печи (частота 2,45 ГГц, мощность 800 Вт, SHARP). В результате постепенного высушивания образовывались смешанные пористые полимерные композиции, содержащие антиоксиданты.

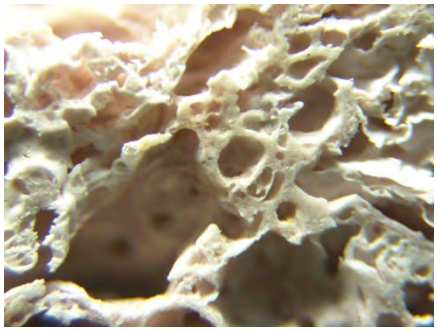
По второй схеме смешение раствора полимера осуществляли в цилиндрическом реакторе, в который помещали излучатель ультразвуковых колебаний (УЗДН-А). После 1–3 минут диспергирования смеси в реактор вводился слой воды. Над нижним слоем смеси полимеров с растворами антиоксидантов размещался слой воды высотой 3–5 см.

Подготовленный таким способом реактор помещался в СВЧ-печь (частота 2,45 ГГц, мощность 800 Вт, SHARP.). В результате нагрева при взаимодействии с СВЧ-излучением на поверхности воды формировался пористый композит. Аналогичным способом из смеси полимера с раствором оммохрома были получены образцы композитов в виде плёнок (при смешении раствора полимера и раствора оммохрома в соотношении 8:1 и 6:1. При УЗ-диспергировании смеси с оммохромом образуется большое количество пены Прогрев в СВЧ-печи в течение 1 минуты привел к кипению смеси и выбросу продукта из реактора в виде плёнки. Образец с большим содержанием оммохрома начинал кипеть через 15 секунд, что связано с пенообразованием композиции. Смешение полимера с раствором оммохрома проводили при соотношении компонентов 6:1. Смесь с оммохромом легко диспергировалась в течение 1 минуты до появления пены. В течение 30 сек СВЧ-нагрева образовался продукт смешения, рис. 1 а, б.

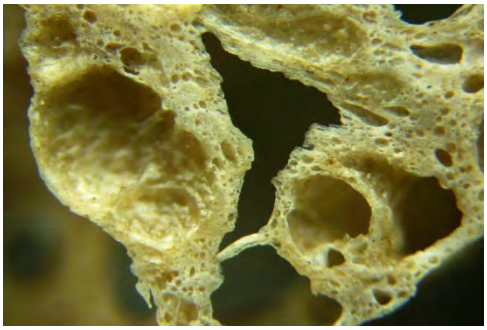
Смешение 10 % растворов ПКЛ в хлороформе проводили в условиях ультразвукового диспергирования с раствором оммохрома в метаноле. Смешение проводили при соотношении компонентов 8г (ПКЛ) и 1,5г раствора оммохрома. В результате нагрева в СВЧ-печи в течение 10 минут по 1 – одной минуте нагрева вес образца уменьшился в 10 раз.

Теплофизическими методами (ТГА, ДСК) проводили регистрацию смешения компонентов участвующих в процессе смешения. Термогравиметрический анализ (ТГА) образцов проводили на термомикровесах TG 209 F1 Iris фирмы «Netzsch» (Германия). Навески образцов составляли 5–8 мг,

анализ проводился при скорости нагревания 20 град/мин. Методом дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) определяли тепловые эффекты образующиеся при нагревании антиоксидантов и тепловые эффекты смешанных композиций (на сканирующем калориметре «Netzsch», Германия, модель DSC-204 F1) при скорости нагревания 10 град/мин в диапазоне 30–250 °С в токе инертного газа – аргона.



(а)



(б)

Рисунок 1 – Вспененные образцы композитных полимерных пен с оммохромом на основе ПКЛ (а) и ПГБ (б)

После смешения компонентов проводили этапы определения концентрации выхода антиоксиданта из полимерной матрицы и антиоксидантную активность биоактивного компонента. Для проведения спектральных исследований по определению выхода антиоксиданта – оммохрома из полимерных пористых матриц ПГБ и ПКЛ были приготовлены по первой экспериментальной схеме смеси в условиях ультразвукового диспергирования и микроволнового нагрева. При смешении раствора полимера и раствора оммохрома в соотношении (8:1 и 6:1, по массе) в ультразвуковом поле образуется большое количество пены.

Поскольку выход оммохрома происходил в фосфатный буферный раствор, была изучена стабильность этого соединения в воде в течение 48–144 часов. На рис. 2 приведены спектры оммохрома в УФ области спектрального диапазона в зависимости от времени экспозиции в фосфатном буфере.

Из рисунка видно, что химическая структура оммохрома практически не изменяется. Отсюда можно сделать вывод о стабильности этого соединения на протяжении всего периода высвобождения из полимерной матрицы. На рис. 3, показано, что этот период может составлять для различных матриц 7–9 суток.

Далее в работе приведены результаты спектральных исследований выхода оммохрома из полимерной матрицы и оценки антиоксидальной активности. Пролонгированное высвобождение антиоксиданта из пористого полимерного носителя создает необходимый терапевтический эффект. При этом механизм высвобождения на первом этапе определяется простой диффузией (до 3 суток для ПЛА и до 7 суток для ПГБ). Затем диффузия оммохрома сопровождается гидролизом полимерной матрицы. Как видно из пористого матрицы на основе ПКЛ оммохром выделяется значительно быстрее, по сравнению с ПГБ. Это объясняется высокой кристалличностью и жесткостью полимерных цепей последнего.

На рисунке 3 представлены данные по кинетике выхода оммохрома в буферный раствор из двух образцов биокомпозитов. Диффузионная кинетика была изучена спектральным методом. Зарегистрированый выход оммохрома в буферный раствор из биокомпозитных матриц на основе ПКЛ и ПГБ позволяет надеяться на удовлетворительный терапевтический эффект при применении данных материалов для медицинских целей.

Далее были проведены исследования антиоксидантной активности оммохрома, десорбированного из биокомпозитной матрицы. Антиоксидантная активность оммохромов определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемилюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [5]. В качестве измеряемого параметра была взята максимальная амплитуда хемилюминесценции в контроле и в присутствии разных количеств антиоксидантов.

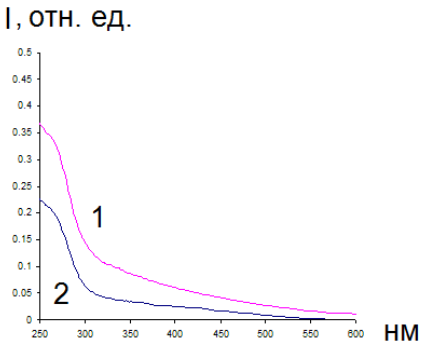


Рисунок 2 – Спектры поглощения оммохрома на вторые (1) и шестые (2) сутки биодеградации образца на основе ПКЛ в фосфатном буфере

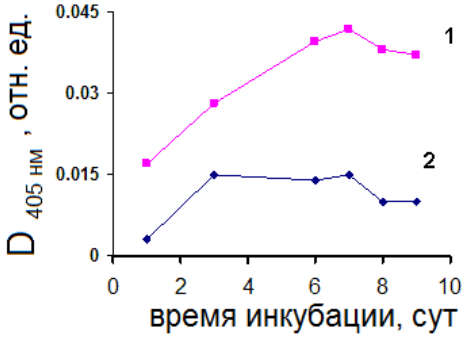


Рисунок 3 – Зависимость выхода оммохромов в буферном растворе в зависимости от времени инкубации материала при температуре 37 °С. 1 – образец на основе ПКЛ, 2 – образец на основе ПГБ

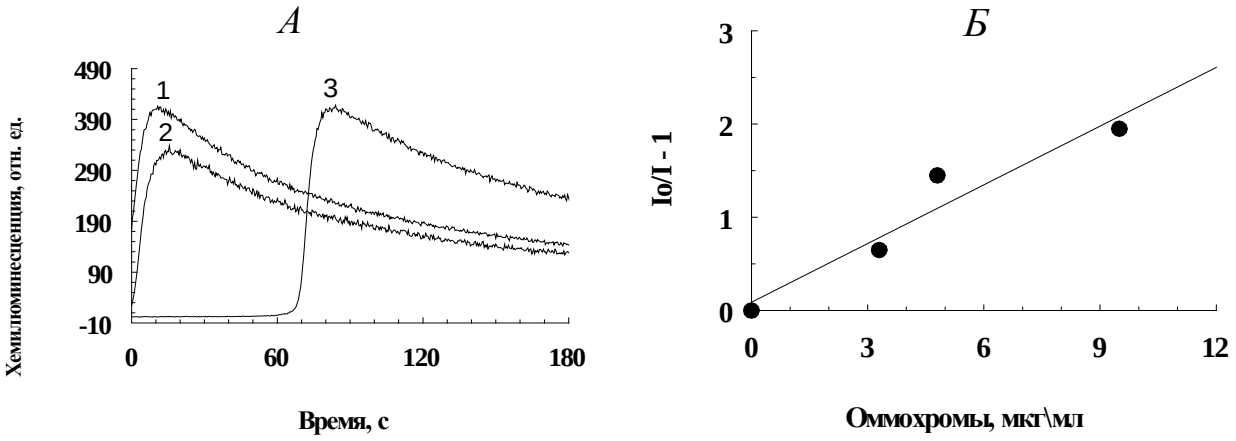


Рисунок 4 – Антиоксидантная активность оммохромов глаза мухи черная львинка (*Hermetia illucens*) высвобожденных из биокомпозитной полимерной матрицы. (А) Тушение хемилюминесценции люминола. Добавлено: 1 – исходные оммохромы; 2 – оммохромы, вышедшие в окружающую среду после разложения полимера; 3 – тролокс. (Б) Определение антиоксидантной активности оммохромов, освобожденных из полимера. I_o – интенсивность хемилюминесценции в отсутствии оммохромов; I – интенсивность хемилюминесценции в присутствии различных концентраций оммохромов; контролем служили пробы, содержащие чистый растворитель (MeOH-HCl)

Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu» RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм и комнатной температуре. Результаты сравнивали с действием водорастворимого аналога витамина Е тролокса (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, Swiss), измеряя в тех же условиях зависимость амплитуды хемилюминесценции от концентрации тролокса.

Результаты показали, что оммохромы, освободившиеся из полимера в результате его деградации не теряли своей антиоксидантной активности, которая для концентрации оммохромов в 1 г\л была в среднем эквивалентна антиоксидантной активности 4,0 мМ тролокса.

Литература

1. Das A., Ringu T., Ghosh S. et al. A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers // Polym. Bull. 2023. 80, 7247–7312. https://doi.org/10.1007/s00289–022–04443–4

2. Pires P.C. et al. Polymer-based biomaterials for pharmaceutical and biomedical applications: A focus on topical drug administration // European Polymer Journal. 2023. V. 187. P. 111868. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.111868.

3. Smola-Dmochowska A., Lewicka K., Macyk A., Rychter P., Pamuła E., Dobrzyński P. Biodegradable Polymers and Polymer Composites with Antibacterial Properties // Int. J. Mol. Sci. 2023. 24. 7473. https://doi.org/10.3390/ijms24087473

4. Romero Y. Antiradical capacity of ommochromes // J. Mol. Model. 2015. 21. 220. http s://doi.org/10.1007/s00894-015-2773-3

5. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Измерение антиоксидантной активности плазмы крови в системе гемоглобин – пероксид водорода – люминол // Вопросы Мед. Химии. 1997. 43. 87–92.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-39-40

УДК 615.27

ВЛИЯНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ В ОСТЕОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Н.А. Надеждина, Ю.И. Тарануха, М.В. Покровский, С.В. Надеждин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Введение

Рекомбинантный эритропоэтин (рЭПО) широко используется в клинической практике, однако лечение рЭПО инициирует дополнительные нежелательные эффекты, которые включают снижение костной массы, что повышает риск переломов у людей с высокими уровнями эритропоэтина [1]. Сегодня уже установлено, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) обеспечивают регенерацию костной ткани посредствам дифференцировки в остеобласты [2, 3], при этом влияние рекомбинантного эритропоэтина на МСК изучено недостаточно.

Цель работы – провести оценку воздействия различных концентраций субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека на пролиферацию и дифференцировку в остеогенном направлении мезенхимных стволовых клеток человека.

Материалы и методы

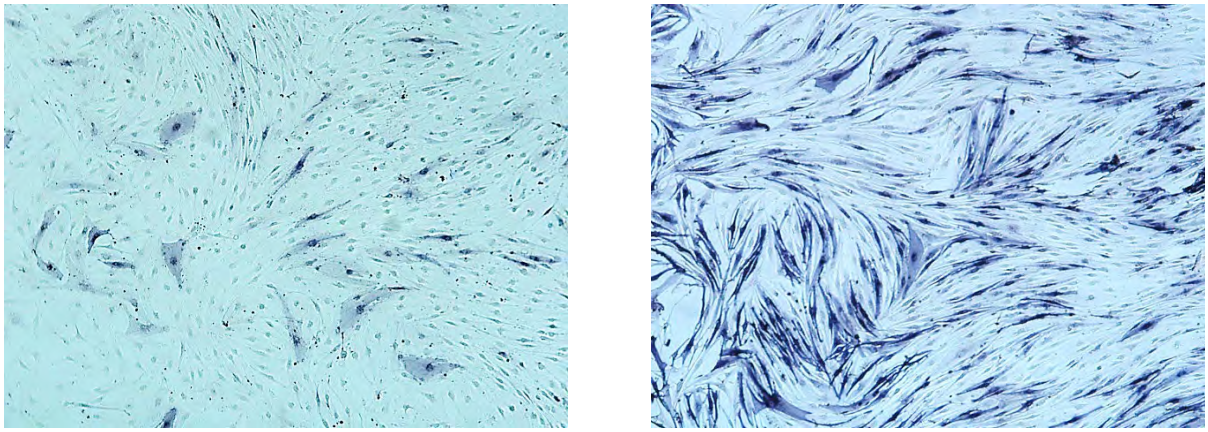
В работе использовали мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека выделенные из жировой ткани (ООО «БиолоТ», РФ), которые культивировали в питательной среде DMEM/F12 (ООО «БиолоТ», РФ) с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой, глутамином и антибиотиками в CO_2 инкубаторе при 37 °С, 5 % CO_2. МСК в количестве $0{,}02x10^6$ вносили в лунки 96 луночных планшетов, в которые добавляли рекомбинантный эритропоэтин человека в разведении 1:100, 1:1000, 1:10000 и 1:100000. В качестве исходного раствора использовали 1 мл рЭПО (Кат. №: PSG110–10, продуцент клеточная линия СНО, молекулярный вес: Около 33 кДа, ООО «СайСторЛаб», РФ). Контролем явилась питательная среда DMEM/F12 (ООО «ПанЭко», РФ) с 10 % ЭТС, 2 mM глутамина и антибиотиками (пенициллин / стрептомицин 100 мкг/мл). Индекс пролиферативной активности (ПАинд., в %) МСК оценивали на 3 день с использованием реагента МТТ (Sigma-Aldrich, США) по формуле): ПАинд. = ОПо/ОПк х100 %, где ОП – оптическая плотность; э – опытная группа; к – контрольная группа. Способность дифференцировки МСК в остеогенном направлении оценивали на 7 день культивирования по экспрессии щелочной фосфатазы при помощи реагента BCIP® /NBT (Sigma-Aldrich, США) на фотометре (Multiskan FC, Thermo Scientific, США). Индекс остеоиндуктивной активности (ОСТинд, в %) рассчитывали по формуле: ОСТинд. = ОПо/ОПк х100 %, где ОП – оптическая плотность; о – опытная группа; к – контрольная группа.

Полученные результаты обрабатывали с помощью ПО Statistica 10.0, нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро-Уилкса. Значимость межгрупповых различий оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) при $p<0.05$,

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что увеличение пролиферативной активности МСК отмечается при разведении 1:10000 (ПАинд. составил 117,89 %), различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0{,}05$. Необходимо отметить, что при разведении 1:100 (ПАинд. составил 101,81 %), нет увеличения пролиферативной активности МСК, различия по сравнению с группой контроля не достоверны. Снижение пролиферативной активности МСК установлено в разведении 1:100000 (ПАинд. составил 106,61 %), различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0{,}05$.

Активация дифференцировки МСК в остеогенном направлении установлена, начиная с разведения 1:100 (ОСТинд. составил 112,51 %) и 1:1000 (ОСТинд. составил 128,87 %), различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0{,}05$ (рис. 1.). при этом экспрессия щелочной фосфатазы была наибольшей в разведении 1:1000. Снижение экспрессии щелочной фосфатазы установлено в разведении 1:10000 (ОСТинд. составил 118,14 %), различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0{,}05$.



(а) (б)

Рис. 1. Экспрессия щелочной фосфатазы в МСК у контрольной (А) и опытной групп (Б) при разведении 1:1000. Ув. х 100

Заключение

Рекомбинантный эритропоэтин в меньших разведениях не повышает пролиферативную активность МСК, наибольшая пролиферативная активность МСК установлена в разведении 1:10000, при этом снижение пролиферативной активности выявлено в разведении 1:100000. Активация дифференцировки МСК в остеогенном направлении напротив, увеличивается в меньших разведениях. Наибольшая экспрессия щелочной фосфатазы выявлена в разведении 1:1000, тогда как в разведении 1:10000 отмечается снижение экспрессии щелочной фосфатазы МСК.

Таким образом, субстанция рекомбинантного эритропоэтина человека оказывает существенное воздействие на пролиферацию и дифференцировку в остеогенном направлении МСК, что необходимо учитывать при дозировании лекарственного прапарата, где рЭПО основное действующее вещество.

Литература

1. Kristjansdottir HL, Lewerin C, Lerner UH, et al. // J Bone Miner Res. 2020. V. 35(2). P. 298–305. https://doi.org/10.1002/jbmr.3900
2. Infante A., Rodríguez C.I. Stem Cell Res Ther. 2018; 9: 244. https://doi.org/10.1186/s13287–018–0995-x
3. Sun Y., Wan B., Wang R., Zhang B., Luo P., Wang D., Nie J-J., Chen D., Wu X. Front. Cell Dev. Biol. 2022. 10:808303. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.808303

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-41-45

УДК 579.66

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ANABAENA SPHAERICA BORN. ET FLAH. IPPAS B-404

М.С. Темнов, Я.В. Устинская, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий

ФГБОУ ВПО «Тамбовский государственный технический университет», Тамбов, Россия

Введение

Цианобактерии представляют собой грамотрицательные оксигенные фотосинтезирующие бактерии, которые обитают на Земле 2,8 млрд лет и способствуют изменениям в геохимии и биологии нашей планеты [1]. Эти микроорганизмы встречаются в различных экологических нишах: водные экосистемы, пустыни, полярные регионы, пещеры и даже в симбиозе с другими организмами, такими как грибы, с образованием, например, лишайников. Цианобактерии сформировали современную атмосферу Земли, обогатив ее кислородом за счет оксигенного фотосинтеза [2, 3], но при этом они также могут наносить значительный вред экосистемам из-за токсического цветения, в процессе которого они выделяют токсины различной природы, вызывающие гибель многих организмов [4]. В настоящее время активно изучаются биоактивные соединения цианобактерий, обнаружено более 1100 биологически активных метаболитов этих микроорганизмов [5]. Биологически активные соединения цианобактерий, ингибирующие рост, развитие и жизнеспособность различных организмов, могут найти применение в фармацевтике, например, в качестве противовирусных и антибактериальных соединений. В настоящее время ученые активно интересуются этими микроорганизмами – потенциальными продуцентами новых антибиотиков. Поиск новых продуцентов антибиотических веществ актуален в связи с увеличением устойчивости бактерий к используемым в настоящее время антибиотическим веществам [6]. Одним из наиболее перспективных продуцентов антибиотических веществ считается род цианобактерий Anabaena [7]. В исследованиях [8, 9] было установлено, что липидные экстракты цианобактерий Anabaena проявляют антибактериальные свойства в отношении Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium.

Цель работы – исследование влияния условий культивирования на антибактериальные свойства в отношении грамположительных бактерий неполярных экстрактов экзо- и эндометаболитов цианобактерий Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404, определение минимальной ингибирующей концентрации этих экстрактов.

Материалы и методы

Культивирование штамма цианобактерий Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404, полученного из Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, осуществлялось в фотобиореакторе (5 л) при аэрации газовоздушной смесью с концентрацией углекислого газа 0,02 % (расход (3±0,5) л/мин) на среде Заррука в течение 7 дней при температуре и уровне фотосинтетически активной радиации (ФАР) согласно таблице 1.

Таблица 1 – Условия культивирования штамма Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404

Режим культивирования	ФАР, мкмоль фотонов/(м^2·с)	Температура, °С
1	33±0,1	20±0,1
2	100±0,1	20±0,1
3	33±0,1	36±0,1
4	100±0,1	36±0,1

Отделение фугата от биомассы цианобактерий (образцы 1, 2, 3 и 4) осуществлялось с использованием центрифуги Sigma 2–16 PK/2–16P при скорости вращения 4000 об/мин в течение 10 минут.

Определение концентрации клеток цианобактерий в суспензии осуществлялось гравиметрическим методом: предварительно взвешенную пробирку наполняли сконцентрированной суспензией цианобактерий, затем помещали в сушильный шкаф при температуре 40 °С и сушили до постоянной массы (Δ = 0,01 г.), затем взвешивали.

Сухую биомассу определяли по формуле:

$$M = (a-b)/V, \quad (1)$$

где M – сухая биомасса, г/мл; a – масса пробирки со сконцентрированной биомассой клеток микроводорослей, г; b – масса пробирки (фильтра) без осадка, г; V – объем культуральной жидкости, мл.

Полученная биомасса клеток влажностью 98–99 % делилась на образцы объемом по 25 мл и подвергалась дезинтеграции при воздействии ультразвука мощностью 150 Вт в течение 300 с. После чего дезинтегрированные клетки сушились до постоянной массы при температуре 40 °С (Δ = 0,01 г.).

Экстракция неполярных соединений осуществлялась путем добавления к биомассе клеток микроводорослей петролейного эфира в соотношении 1 г биомассы : 50 мл петролейного эфира, экстракция осуществлялась в течение 8 часов с применением аппарата Сокслета. Определение массовой доли извлеченных липидов осуществлялось по формуле:

$$Мл = ((m1-m2)/m1)\cdot 100\ \%, \quad (2)$$

где $M_л$ – массовая доля извлеченных липидов, %; m_1 – масса высушенной биомассы клеток микроводорослей до экстракции, г; m_2 – масса высушенной биомассы клеток микроводорослей после экстракции, г.

Экстракция неполярных соединений из культуральной жидкости (КЖ) осуществлялась в аппарате с мешалкой (при скорости вращения мешалки 600 об/мин), температуре 40 °С в течение 3 ч с использованием в качестве экстрагента петролейного эфира (ПЭ) при соотношении 1,14 мл (КЖ) : 1 мл (ПЭ).

Полученные экстракты концентрировались с применением ротационного испарителя ИР-1М3.

Количественный состав неполярной фракции, извлеченной из культуральной жидкости, определялся методом тонкослойной хроматографии с применением в качестве подвижной фазы смеси петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота (90(об.) : 10(об.) : 1 (об.)) [10].

На втором этапе эксперимента на питательную среду МПА (толщина слоя агара в чашке 4±0,5 мм), залитой в чашки Петри, вносилось 50 мкл грамположительных бактерий с концентрацией $99{,}9\cdot 10^6$ КОЕ/мл. Далее в чашку Петри вносились диски, на которые было нанесено от 25 до 100 мкг неполярного экстракта экзо- или эндометаболитов цианобактерий Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404. Затем чашки Петри помещались в термостат на 20 ч при температуре 37 °С. Часть чашек Петри освещалась белым светом с уровнем ФАР = 100±20 мкмоль фотонов/($м^2\cdot с$), вторая часть чашек культивировалась в темноте. Положительный контроль во всех экспериментах – азитромицин – 15 мкг. Отрицательный контроль – петролейный эфир – 80 мкл. Величины зон ингибирования роста бактерий вокруг дисков с веществами, представленные в таблицах 3 и 4, представляют собой среднее арифметическое по результатам трех параллельных опытов. Минимальная ингибирующая концентрация (MIC) экстракта неполярных веществ была определена с применением метода, описанного в [11].

Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента показали, что условия культивирования оказывают значительное содержание на количество биомассы клеток и содержание неполярных соединений в культуральной жидкости и биомассе клеток Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404 (табл. 2).

Наибольшая концентрация биомассы клеток на 7 сутки культивирования 19,4 г/л наблюдалась при росте штамма в условиях режима 4 (ФАР=100±0,1 мкмоль фотонов/($м^2\cdot с$); температура =36±0,1 °С). Наиболее значительное накопление неполярных соединений (липидной природы) наблюдается в условиях культивирования режима 1 (ФАР=33±0,1 мкмоль фотонов/($м^2\cdot с$); температура =20±0,1 °С), что связано, возможно, с тем, что данные условия культивирования являются стрессовыми для штамма и вызывают значительную перестройку метаболизма.

Таблица 2 – Результаты эксперименты по культивированию цианобактерий Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404

Параметры	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
Концентрация биомассы на 7 сутки, г/л	10,0	7,8	11,8	19,4
Неполярные соединения в КЖ (7 сутки), мг/л	431	80	169	178
Неполярные соединения в биомассе, % (масс.)	18,5	5,2	4,0	5,1

На втором этапе эксперимента исследовались антибактериальные свойства полученных экстрактов. Было определено, что все экстракты, содержащие неполярные вещества культуральной жидкости, обладают антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету, так и в темноте (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты эксперимента по исследованию антибактериальных свойств неполярных веществ, извлеченных из культуральной жидкости цианобактерий Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404 (при α = 0,05; n=3)

Количество экстракта на диске	Неполярные экстракты из культуральной жидкости Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота (ФАР= 0 мкмоль фотонов/(м^2·с))			
1000 мкг	12,67±1,22	13,33±1,22	19,53±3,28	17,87±2,95
500 мкг	8,77±0,02	11,03±1,55	11,67±1,22	7,17±0,31
100 мкг	6,63±0,01	7,43±0,20	-	-
50 мкг	-	6,83±0,89	-	-
MIC, мкг/мл	90 (R^2=0,9)	41 (R^2=0,95)	330 (R^2=1)	462 (R^2=1)
Свет (ФАР=100±0,1 мкмоль фотонов/(м^2·с))				
1000 мкг	28,67±4,90	23,67±1,22	21,37±1,48	15,43±0,09
800 мкг	24,67±4,90	22,67±1,22	19,90±1,03	13,57±1,63
600 мкг	22,67±4,90	19,33±4,90	19,07±1,81	11,60±0,42
400 мкг	15,00±0,91	17,33±4,90	14,30±1,80	11,33±0,22
200 мкг	14,67±1,22	15,33±4,90	8,33±1,22	7,9±0,99
100 мкг	8,40±0,26	14,33±1,22	7,60±1,76	-
50 мкг	7,33±1,22	6,67±1,22	-	-
25 мкг	-	6,50±0,70	-	-
MIC, мкг/мл	(R^2=0,9)	27 (R^2=0,95)	101 (R^2=0,95)	131 (R^2=0,95)

Было установлено, что при дополнительном воздействии светового излучения повышается эффективность воздействия экстракта на грамположительные бактерии, величина минимальной ингибирующей концентрации уменьшается в 1,5–3,5 раза. Что можно объяснить, по-видимому, теорией перекисного окисления органических соединений Баха-Энглера, развитой в дальнейшем академиком Н.Н. Семеновым на основе разработанной им теории цепных реакций [12–14].

Поток фотонов инициирует окисление веществ липидной природы, что приводит к появлению липидных радикалов:

$$L–H+HO^*\rightarrow H2\ O+L^* \quad (3)$$

Липидные радикалы реагируют с O_2 с образованием пероксидных радикалов, которые взаимодействуют с новыми молекулами липидов

$$L^*+O2\rightarrow (L–O2)^* \quad (4)$$

$$L^*–O2+LH \rightarrow LOOH+L^* \quad (5)$$

Образующие реакционные активные радикалы вызывают окисление жирных кислот, входящих в состав цитоплазматических мембран грамположительных бактерий, в то время как у цианобактерий гораздо лучше развита защита от подобных соединений, образующих в результате воздействия света, ведь эти организмы миллиарды лет используют световое излучение в качестве источника энергии и выработали способ защиты от его негативного воздействия (антиоксидантная система).

Такому окислению подвергаются в первую очередь вещества, содержащие ненасыщенные жирные кислоты. Причем их превращения могут идти как с разрывом двойной связи и образованием перекисей, так и без – по свободно-радикальному механизму. Насыщенные кислоты реагируют медленно и только по свободно-радикальному механизму. В связи с чем можно предположить, что экстракты, содержащие большее количество ненасыщенных жирных кислот, имеют меньшую минимальную ингибирующую концентрацию. Это подтверждается результатами эксперимента, как видно из таблицы 3, меньшую величину ингибирующей концентрации имеют образцы 1 и 2, культивируемые при пониженной температуре 20±0,1 °С: для сохранения жизнеспособности клетки цианобактерий перестраивают метаболизм и синтезируют большое количество ненасыщенных жирных кислот, которые имеют более низкую температуру плавления и позволяют сохранить жизнеспособность клеткам (сохраняя жидким околоклеточное пространство и сохраняя жизнеспособность клеточной мембраны).

При этом, вероятно, в клетках Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404 содержатся липиды другого состава, из-за чего экстракты из биомассы обладают значительно менее выраженными ингибирующими свойствами в отношении грамположительных бактерий (табл. 4).

Таблица 4 – Результаты эксперимента по исследованию антибактериальных свойств неполярных веществ, извлеченных из биомассы цианобактерий Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404 (при α = 0,05; n=3)

Количество экстракта на диске	Неполярные экстракты из биомассы Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота (ФАР= 0 мкмоль фотонов/(м^2·с))			
1000 мкг	7,67±1,22	-	-	7,77±0,05
900 мкг	-	-	-	7,16±0,31
MIC, мкг/мл	1000	-	-	830 (R^2=1)
Свет (ФАР=100±0,1 мкмоль фотонов/(м^2·с))				
1000 мкг	8,67±4,9	-	-	8,80±0,15
900 мкг	-	-	-	8,4±0,11
800 мкг	-	-	-	7,87±2,99
500 мкг	-	-	-	7,70±0,59
200 мкг	-	-	-	6,92±0,05
100 мкг	-	-	-	6,40±0,48
MIC, мкг/мл	1000	-	-	72 (R^2=0,94)

Антибактериальные свойства имеют неполярные экстракты из биомассы клеток, выращенных в условиях режима культивирования 1 и 4. Причем эффективность экстракта (режим 4) также зависит от воздействия светового излучения – при воздействии света минимальная ингибирующая концентрация уменьшается в 11,5 раза. Экстракт (режим 1) проявляет минимальные ингибирующие свойства в отношении грамположительных бактерий только в очень высокой концентрации 1000 мкг/мл.

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что неполярные вещества культуральной жидкости Anabaena sphaerica Born. et Flah. IPPAS B-404 обладают значительными антибиотическими свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету (ФАР=100±0,1 мкмоль фотонов/(м^2·с)), так и в темноте. Условия культивирования штамма значительно влияют на эффективность воздействия экстракта в отношении грамположительных бактерий, наиболее перспективны режимы культивирования 1 и 2, позволяющие получить неполярные экстракты, имеющие величины минимальной ингибирующей концентрации 54–90 мкг/мл и 27–41 мкг/мл соответственно.

Литература

1. Gugger, M.F. Cyanotoxins and other bioactive compounds from the pasteur cultures of cyanobacteria (PCC) / M.F. Gugger, A. Boullié, T. Laurent // Toxins. – Vol. 15, № 6. – e388. DOI: 10.3390/toxins15060388.

2. Schirrmeister, B.E. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils / B.E. Schirrmeister, M. Gugger, P.C. Donoghue // Palaeontology. – 2015. – Vol. 58. – P. 769–785. DOI:10.1111/pala.12178.

3. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing / P.M. Shih, D. Wu, A. Latifi et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2013. – Vol. 110. – P. 1053–1058. DOI: 10.1073/pnas.1217107110.

4. Cyanobacterial blooms / J. Huisman, G.A. Codd, H.W. Paerl et al. // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Vol. 16, № 8. – P. 471–483. DOI:10.1038/s41579–018–0040–1.

5. Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the Cyanobacteria / E. Dittmann, M. Gugger, K. Sivonen, D.P. Fewer // Trends in Microbiology. – 2015. – Vol. 23, № 10. – P. 642–652. DOI: 10.1016/j.tim.2015.07.008.

6. Microalgae and cyanobacteria strains as producers of lipids with antibacterial and antibiofilm activity / V. Cepas, I. Gutiérrez-Del-Río, Y. López et al. // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19. – P. 675–694. DOI: 10.3390/md19120675.

7. Extracellular antibacterial substances in Anabaena fertilissima CCC597 kill bacteria by triggering oxidative radicals and destroying membrane integrity / T. Singh, P. Kumar, D. Suvendra, N. Bagchi // Nova Hedwigia. – 2020. – Vol. 110, № 3. – P. 247–267. DOI: 10.1127/nova_hedwigia/2020/0573.

8. In vitro antibacterial evaluation of Anabaena sp. against several clinically significant microflora and HPTLC analysis of its active crude extracts / A. Chauhan, G. Chauhan, P. Gupta et al. // Indian Journal of Pharmacology. – Vol. 42, № 2. – P. 105–107. DOI: 10.4103/0253–7613.64490.

9. Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches / J. Zhou, M. Wang, J.A. Saraiva, et al. // Food Chemistry. – 2022. – Vol. 384. – e132236. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132236.

10. Кейтс, М. Техника липидологии / М. Кейтс. – Москва: Мир, 1975. – 322 с.

11. Bonev, B. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method / B. Bonev, J. Hooper, J. Parisot // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – Vol. 61, № 6. – С. 1295–1301. DOI: 10.1093/jac/dkn090.

12. Пурмаль, А.П.В. Простая кинетика сложных реакций: учебное пособие / А.П. Пурмаль Москва: МФТИ, 2011. – 109 с.

13. Ермакова, Н.В. Свободно-радикальное окисление жирных кислот молочного жира / Н.В. Ермакова // Химическая кинетика и цепные реакции: теория и практика: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, к 125-летию со дня рождения академика Н.Н. Семёнова, Орел, 27 ноября 2020 года. – Орел: Картуш, 2020. – С. 30–33.

14. Experimental research into the antibiotic properties of Chlorella vulgaris algal exometabolites / D. Dvoretsky, S. Dvoretsky, M. Temnov et al. / Chemical Engineering Transactions. – 2019. – Vol. 74. – P. 1429–1434. DOI: 10.3303/CET1974239.

Актуальная биотехнология
№2, 2023 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-46-47
УДК 57.083.18

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ ЧЕЛОВЕКА

С.А. Лапа, С.А. Суржиков, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Инфекционная пневмония – острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый широким рядом возбудителей. Вспышки инфекционных пневмоний, вызванных вирусными и бактериальными возбудителями, являются серьезной социальной угрозой. От своевременной постановки точного диагноза зависит успешность назначенной терапии и стратегия лечения пациента в целом [1]. Ранее мы докладывали о разработке мультиплексной ПЦР в одном общем объеме для видового определения бактериальных возбудителей пневмонии человека [2]. Это позволило нам сформулировать требования к видоспецифичным праймерам и оптимизировать ПЦР в мультиплексном варианте. Развитием тест-системы [2] стала разработка мультиплексной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в иммобилизованной фазе для выявления шести бактериальных и двух вирусных возбудителей инфекционной пневмонии человека [3].

В качестве весьма привлекательной альтернативы ПЦР в настоящее время рассматриваются активно развивающиеся методы изотермической амплификации; одним из наиболее перспективных является метод рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA).

Нами разработана диагностическая система, основанная на RPA, для выявления шести бактериальных возбудителей пневмонии человека. Сконструированы и оптимизированы видоспецифичные праймеры для проведения мультиплексной реакции в одном общем объеме. Использованы меченые праймеры для надежной дискриминации близких по размеру продуктов амплификации.

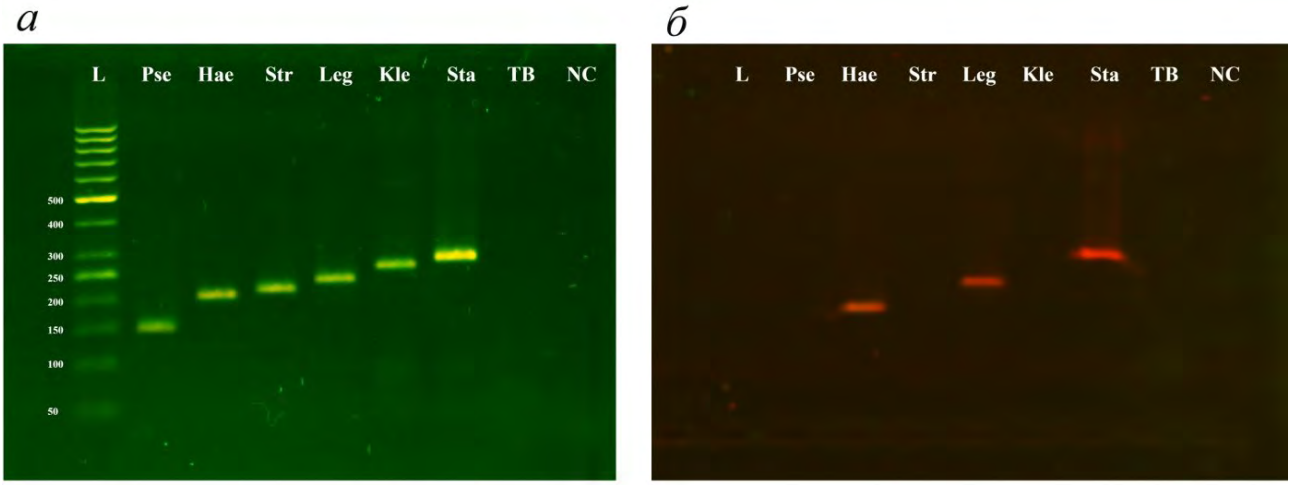


Рисунок 1. Визуальная идентификация возбудителя пневмонии на электрофореграмме. а – Неизбирательная детекция ДНК с помощью красителя SYBR Green I; б – избирательная идентификация продуктов удлинения праймеров, содержащих цианиновый краситель Cy5. Окрашивание праймеров, специфичных к H. influenzae, L. pneumophila и Staphylococcus aureus, позволяет надежно дискриминировать соответствующие продукты амплификации от не несущих флуоресцентную метку: P. aeruginosa, S. pneumoniae, K. pneumoniae. Обозначения: L – маркер длин ДНК Ladder GeneRuler 50bp (“Thermo Fisher Scientific”), Pse – P. aeruginosa, Hae – H. influenzae, Str – S. pneumoniae, Leg – L. pneumophila, Kle – K. pneumoniae, Sta – Staphylococcus aureus, TB – M. tuberculosis (контроль специфичности праймеров), NC – отрицательный контроль. Цифрами слева обозначена длина двухцепочечных ДНК (от 50 до 500 п.н.)

В работе использовали ДНК штаммов из коллекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск), в том числе клинические и природные изоляты. Перед выделением ДНК изоляты из природных источников, а также клинические образцы культивировали на селективных средах. ДНК из культур выделяли и деконтаминировали с использованием СТАВ-метода. Работы с изолятами и живыми коллекционными культурами проводили на базе указанного учреждения.

Таблица 1. Штаммы возбудителей бактериальной пневмонии человека, использованные в работе.

Возбудитель	№	Штамм	Источник
Pseudomonas aeruginosa	B-4807	NCTC / ATCC 25668	
	B-7565	ATCC 17650	
	B-8361	DE 177	клинический штамм
Haemophilus influenzae	B-7400	ATCC 49247	
	B-7399	ATCC 9006 тип a	
	B-9029	Хак-1	клинический штамм
Streptococcus pneumoniae	B-7756	ATCC 49619	
	B-7397	ATCC 6303	
	B-7398	ATCC 6305	
Legionella pneumophila	B-5978	ATCC 33152	
	B-7783	7	природный штамм
	B-8538	OO42	природный штамм
Klebsiella pneumoniae	B-4811	NCTC / ATCC 13883	
	B-7877	KPB-594	клинический штамм
	B-7878	KPB-1802	клинический штамм
Staphylococcus aureus	B-5931	ATCC 25923	
	B-7471	ATCC 43300	
	B-8377	Оренбург_2014 № 67	клинический штамм

Идентификацию возбудителя проводили путем визуального анализа электрофореграммы (Рис. 1). Аналитическая чувствительность разработанной мультиплексной RPA составила 10^2–10^3 копий ДНК. Специфичность метода определяли по отсутствию перекрестной амплификации исследованных образцов ДНК возбудителей пневмонии для каждой пары праймеров, а также для ДНК Mycobacterium tuberculosis H37rv. Для исследованных образцов этот показатель составил 100 %. Время выполнения анализа – менее часа, включая электрофоретический контроль реакции.

Тест-система может найти применение в профильных клинических лабораториях для экспресс-анализа образцов от пациентов с подозрением на пневмонию.

Исследование поддержано грантом РНФ № 22–14–00257.

Литература

1. Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011 // Thorax. – 2011. – 66 Suppl 2:ii1–23.
2. Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Золотов А.М., Заседателев А.С., Чудинов А.В. Мультиплексная ПЦР для выявления бактериальных возбудителей инфекционной пневмонии // Биоорг. Химия. – 2020. – Т. 46. – Стр. 550–552.
3. Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммур Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека // Молекуляр. биология. – 2021 – Т. 55. – № 5. – Стр. 944–955.

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-48-49

УДК 66.047

МАГНИТНЫЕ НАНОБИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ

А.М. Сульман, Д.В. Балакшина, О.В. Гребенникова, В.Г. Матвеева

ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

Ферменты целлюлозы, включая целлюлазу, играют важную роль в биотехнологических процессах в пищевой, косметической, моющей, целлюлозно-бумажной и смежных отраслях промышленности [1]. Низкая термическая стабильность целлюлазы и стабильность при хранении, наличие примесей, утечка фермента и непригодность для вторичной переработки являются основными проблемами во всех этих процессах. Они могут быть преодолены путем создания эффективных нанобиокатализаторов на основе целлюлазы, иммобилизованной в порах мезопористого оксида, содержащего наночастицы магнетита [2].

Мезопористые силикаты являются многообещающими кандидатами для иммобилизации ферментов в соответствии с требованиями, предъявляемыми к носителям ферментов: большая площадь поверхности, узкое распределение пор по размерам, четко определенная геометрия пор, их термическая и механическая стабильность и токсикологическая безопасность. Кроме того, поверхность кремнеземных подложек может быть химически модифицирована различными функциональными группами [3].

Один образец носителя был получен путем синтеза наночастиц магнетита (NPS) с последующим нанесением кремнеземной оболочки. Другой носитель был получен in situ в результате кристаллизации наночастиц Fe_3O_4 в порах 6 нм коммерческого мезопористого оксида кремния.

Активность иммобилизованной целлюлазы была протестирована при гидролизе карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в сравнении со свободной целлюлазой и составила 71 % для Fe_3O_4@SiO_2@CEL и 87 % для SiO_2@Fe_3O_4@CEL по сравнению с нативным ферментом (рис. 1). Вероятно, что такая разница может быть объяснена различной структурой и различием общей площади поверхности и пористости магнитных носителей.

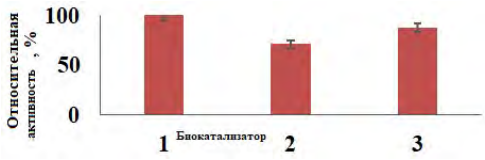


Рисунок 1 – Относительная активность (%) различных биокатализаторов:
(1) Свободный фермент,
(2) Fe_3O_4@SiO_2@CEL,
(3) SiO_2@Fe_3O_4@CEL

Изотермы адсорбции-десорбции (рис. 2) соответствуют типу IV, обычно наблюдаемому для мезопористых материалов. Сравнение пористости магнитного кремнезема с пористостью исходного образца кремнезема показывает, что общая площадь поверхности уменьшается после образования NP магнетита. Для SiO_2 при соотношении Fe_3 O_4 оно составляет 30 %, что указывает на частичную закупорку пор. Распределение пор по размерам остается практически неизменным, что свидетельствует о том, что большинство пор меньшего размера не закупорены.

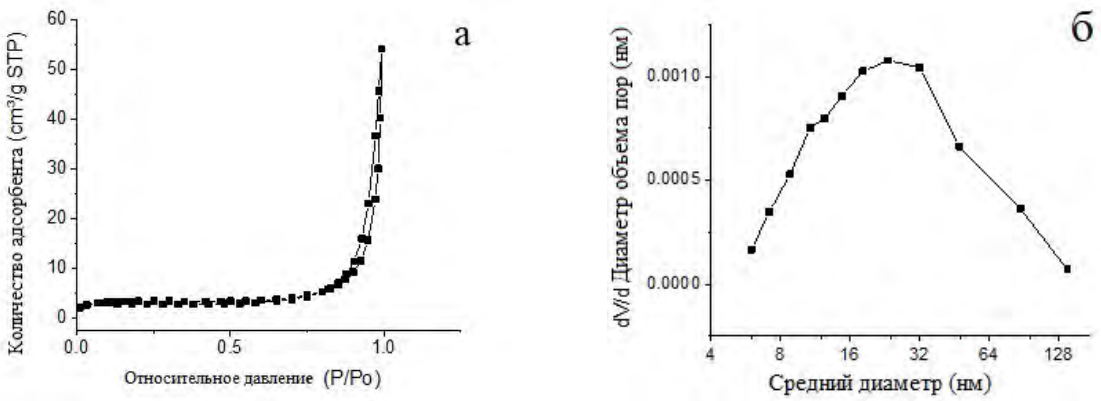


Рисунок 2 – Изотермы адсорбции-десорбции азота (а) и распределения пор по размерам (dV/dD) (б) Fe_3 O_4@SiO_2

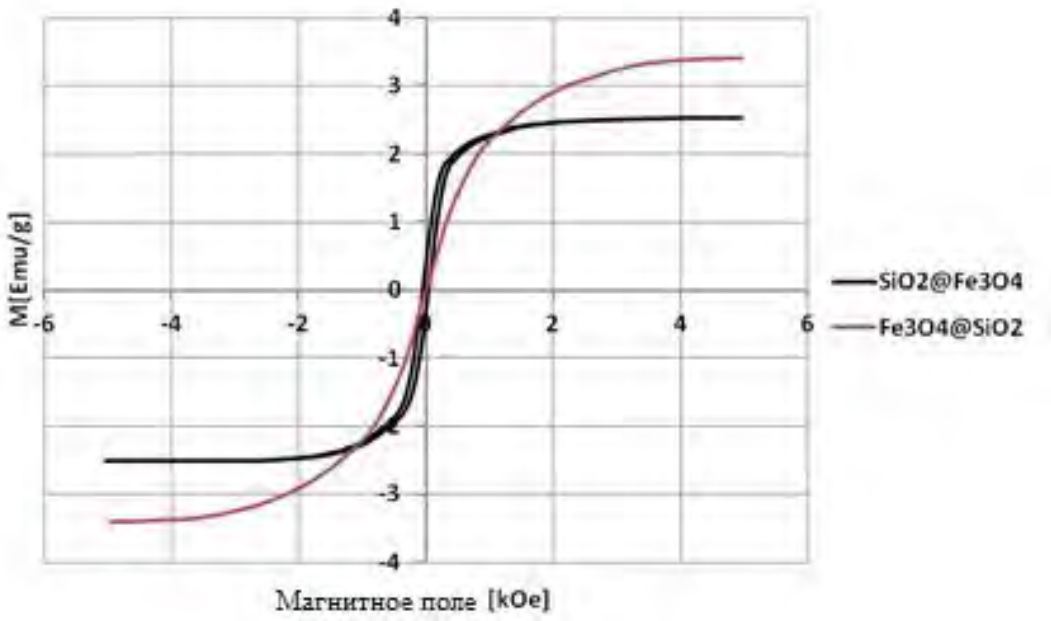


Рисунок 3 – Кривые намагниченности Fe_3O_4@SiO_2 и SiO_2@Fe_3O_4

Кривые намагниченности Fe_3O_4@SiO_2 (рис. 3) показывают среднюю намагниченность насыщения ~3,0 эме/г, что согласуется с малыми магнитными НЧ.

Высокая каталитическая активность SiO_2@Fe_3O_4@CEL в сочетании с легкой магнитной сепарацией и коммерчески доступной исходной кремнеземной подложкой делают этот нанобиокатализатор перспективным для успешной коммерциализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22–79–00052).

Литература

1. Califano. V., Costantini. A., 2020, Immobilization of Cellulolytic Enzymes in Mesostructured Silica Materials. *Catalysts, 10*, 706.
2. Chen B., Qiu J., Mo H., Yu Y., Ito K., Sakai E., Feng H., 2020, Synthesis of mesoporous silica with different pore sizes for cellulase immobilization: Pure physical adsorption. N.J. Chem, 41, 9338–9345.
3. Chengmin H., Ghéczy N., Messmer D., Szymańska K., Adamcik J., Mezzenga R., Jarzębski A.B., Walde P., 2019, Stable Immobilization of Enzymes in a Macro – and Mesoporous Silica Monolith. ACS Omega, 4, 7795–7806.

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-50

УДК 57.083

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Д.К. Армянинова, А.В. Гончаренко

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) вызывает тяжелое, острозаразное заболевание домашних и диких свиней с высокой летальностью. Классификация вируса АЧС осуществляется на основе последовательности гена B646L, кодирующего капсидный белок p72. На настоящий момент обнаружено 24 различных генотипа вируса [1]. В Европе и в Азии, в основном, циркулируют вирусы, относящиеся p72-генотипу II [2, 3]. Диагностика АЧС основана на традиционных методах ПЦР и ПЦР в реальном времени

Вирус АЧС приводит к огромным экономическим потерям, поэтому быстрый и доступный тест для определения АЧС непосредственно на ферме или в ближайшем ветеринарном пункте является значимым для борьбы с эпизоотией.

Цель работы – разработка доступной диагностической тест-системы на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) и колориметрической детекции продуктов реакции. Преимуществом LAMP является возможность её проведения с использованием обычного термостата, что обеспечивает доступность теста широкому кругу потребителей. Был проведен биоинформатический анализ последовательностей гена B646L штаммов, выделенных на территории России и сопредельных государств; разработан дизайн праймеров для проведения петлевой изотермической амплификации. В качестве мишени была выбрана консервативная область гена B646L штамма Odintsovo 02–14, NC_44948. Ген B646L был клонирован в вектор pGEM (Promega) для получения модельного вектора для разработки тест-системы, были оптимизированы условия проведения LAMP и определена её чувствительность. Разработан способ визуальной колориметрической детекции результатов амплификации, основанной на изменении pH реакционной смеси. Использование комбинации pH чувствительного индикатора и красителя, обеспечивает переход цвета реакционной смеси от фиолетового к зеленому в случае положительной реакции. Визуальная детекция результата LAMP позволяет определять ДНК в количестве до 50 фг или $2x10^3$ копий гена в пробе.

Неоспоримым преимуществом разработанной системы диагностики является ее простота и доступность. Детекцию можно проводить в термостате при постоянной температуре. Использование предлагаемой тест-системы даст возможность проводить скрининг поголовья как домашних, так и диких свиней для быстрого выявления инфекции и своевременного проведения карантинных мероприятий.

Литература

1. Quembo C.J., Jori F., Vosloo W., Heath L. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype // Transbound. Emerg. Dis. – 2018. – Vol. 65. № 2. – P. 420–431.

2. Gallardo C., Fernández-Pinero J., Pelayo V., Gazaev I., Markowska-Daniel I., Pridotkas G., Nieto R., Fernández-Pacheco P., Bokhan S., Nevolko O., Drozhzhe Z., Pérez C., Soler A., Kolvasov D., Arias M. Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe // Emerg. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 20. № 9. – P. 1544–7.

3. Ge S., Li J., Fan X., Liu F., Li L., Wang Q., Ren W., Bao J., Liu C., Wang H., Liu Y., Zhang Y., Xu T., Wu X., Wang Z. Molecular Characterization of African Swine Fever Virus, China, 2018 // Emerg. Infect. Dis. 2018. – Vol. 24. № 11. – P. 2131–3.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-51

УДК 577.112.4

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ЛИПИД – ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ LC-LTP2 ДЛЯ ПОИСКА КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В СВЯЗЫВАНИИ ЛИГАНДОВ

А.Е. Потапов, И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова, Д.Н. Мельникова

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Одной из актуальных задач современной медицины является поиск новых лекарственных форм, позволяющих проводить терапию с наименьшим количеством побочных эффектов. Среди достаточно широкого списка форм носителей в выигрышном свете представляются белки-транспортёры, характеризующиеся низкой токсичностью, высокой загрузкой лекарственного вещества, хорошей биосовместимостью, способностью к контролируемому и пролонгированному высвобождению лекарств. Растительные липид-транспортирующие белки (LTP) являются новым, не изученным в этом направлении классом белков-транспортеров. Характерной особенностью LTP является наличие в структуре гидрофобной впадины в форме туннеля, благодаря которой они могут связывать и переносить широкий спектр лигандов, в том числе некоторые лекарственные вещества.

В рамках данной работы в качестве модельного белка использовали липид-транспортирующий белок чечевицы (Lc-LTP2), на примере которого была изучена роль Lys61 и Lys81 в связывании различных гидрофобных лигандов. Lys81 расположен рядом с «нижним» входом гидрофобной впадины и предположительно может быть одной из аминокислот, которые формируют сайт взаимодействия с мембраной. Lys61 находится у «верхнего» входа и потенциально может участвовать, как в связывании лигандов, так и в удержании их в полости белка. В качестве лигандов были выбраны насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с разной длиной ацильной цепи (лауриновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и бегеновая), а также лизолипиды (LMPC, LMPG, LPPC, LPPG).

Методом молекулярного докинга было показано, что при замене Lys61 и Lys81 на аланин способность мутантных аналогов Lc-LTP2 связывать жирные кислоты осталась практически без изменений по сравнению с диким типом, но была утеряна в случае лизолипидов. Далее с использованием инвертированной ПЦР и мутагенизирующих праймеров для введения замен Lys61 и Lys81 на аланин была произведена полноразмерная амплификация базовой экспрессирующей конструкции pET-His8-TrxL-Lc-LTP2. На основе полученной плазмиды и штамма E.coli BL-21 (DE3) была разработана система для гетерологической экспрессии мутантных аналогов Lc-LTP2 (K61A), Lc-LTP2 (K81A), Lc-LTP2 (K61A/K81A).

С помощью флуоресцентной спектроскопии было показано, что все три мутантных аналога Lc-LTP2 с большей специфичностью связывали стеариновую кислоту по сравнению с диким типом, однако для олеиновой кислоты наблюдается противоположный эффект. Вероятно, при изменении размера гидрофобной впадины за счет введенных мутаций более компактная по размеру олеиновая кислота не может удерживаться внутри молекулы белка. Для лизолипидов было показано, что мутантные аналоги Lc-LTP2 связывали все эти лиганды хуже по сравнению с диким типом, а Lc-LTP2(K81A) не связывал LMPC и LPPC.

Для исследования влияния введенных точечных замен на способность Lc-LTP2 взаимодействовать с мембраной, были получены однокомпонентные липосомы, состоящие из POPG и POPC. В качестве маркера разрушения мембраны был выбран анионный краситель кальцеин. В ходе эксперимента было показано, что замены K61A и K81A по отдельности практически не влияют на снижение процесса разрушения заряженных мембран. Только при двойной замене K61A/K81A происходит значительное снижение способности белка разрушать мембраны. Вероятно, только при одновременной замене 2-х ключевых аминокислот Lys61 и Lys81 взаимодействие с поверхностью мембраны уменьшается. Т.к. не только процесс захвата липида из мембраны, в котором участвует Lys81, но и удерживание его в полости белка, в котором участвует Lys61, позволяет белку разрушать целостность липидного слоя.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано ключевое значение Lys81 в связывании с лизолипидами, а также вместе с Lys61 во взаимодействии с мембраной. Полученные данные делают возможным регулирование специфичности белка в отношении различных лигандов и расширят сведения о механизме связывания липид-транспортирующих белков.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22–25–00527)

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-52

УДК 644

ДЕСТРУКТОРЫ НЕФТИ: КОМПЬЮТЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ И СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

М.С. Кондратьев[1], А.А. Бадалов[1], Н.Н. Хечинашвили[1], В.М. Комаров[1], А.А. Самченко[1], И.Ф. Пунтус[2]

[1] Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия
[2] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Россия

До настоящего времени глобальная экономика широко использует переработку жидких углеводородов, а потому случаи катастрофических разливов нефти и ее производных, к сожалению, нередки. Для примера, в нашей стране, при ежегодной добыче нефти 500 млн. тонн в год, порядка 15 млн. попадает в окружающую среду – в результате утечек при транспортировке. Около 75 % состава нефти приходится на углеводороды, среди которых наиболее токсичными являются полициклические ароматические углеводороды. В природе основную роль в их деградации играют микроорганизмы. В результате ряда ферментативных процессов происходит освобождение из ароматических структур углерода с последующим вовлечением его в биологический круговорот. В аэробных условиях разрушение ароматических углеводородов происходит путем расщепления ароматического кольца диоксигеназами. Однако, эти ферменты действуют лишь в том случае, если у ароматического кольца имеются две гидроксильные группы в орто- или пара – положении по отношению друг к другу. Поэтому введение одной или двух гидроксильных групп в ароматическое кольцо является одним из первых этапов биодеградации ароматических соединений – и это осуществляется благодаря ферментам из класса флавиновых монооксигеназ. Многочисленные генетические исследования показали, что наиболее распространенный ген таких ферментов в штаммах флуоресцирующих псевдомонад является ген салицилатгидроксилазы, которая и стала объектом нашего исследования. В литературе известно крайне мало пространственных структур данных нефтедеструкторов, а ведь их знание позволяет не только исследовать полноатомные фермент-субстратные комплексы, но и моделировать процессы каталитических актов, что важно как в фундаментальном, так и в прикладном плане.

Нами было выполнено сравнение FASTA-последовательности фермента с известной структурой (5EVY) и других секвенированных его аналогов, после чего биокатализаторы с неизвестной структурой были реконструированы по гомологии. Далее методом гибкого докинга были получены основные комплексы с типичными субстратами, ранее изученными нами экспериментально (замещенные производные салицилата).

Изучив структуру ферментов, мы выявили места для точечных аминокислотных замен среди периферических аминокислот этих белков – это позволит получить ферменты с улучшенной термостабильностью [1].

1. Khechinashvili NN, Kondratyev MS, Polozov RV. Thermodynamics of globular protein native structure // J Biomol Struct Dyn. 2023 May; 41(8):3218–3221.

https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-53-55

УДК 632.911.2:632.913

К ВОПРОСУ О БИОЛОГИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ ПАТОВАРОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ В УСЛОВИЯХ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

М.А. Кузнецов[1], А.А. Щербаков[1], О.С. Ларионова[1], Е.А. Горельникова[2], Н.С. Червякова[2]

[1] ФГБОУ ВО СГАУ им. Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия
[2] ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия

Введение

Сосудистый бактериоз крестоцветных – опасное заболевание, вызываемое бактериями вида *Xanthomonas campestris*. Инфекция характеризуется высокой поражающей способностью и широким биоразнообразием как поражаемых растений, так и вариантов возбудителя. Последнее связано, в том числе, с обширностью площадей сельскохозяйственных угодий Российской Федерации, характеризующихся широким разнообразием почвенных и климатических условий. В свою очередь, такая изменчивость способствует не только нетипичному проявлению заражения, но и разной степени патогенности и специфичности по отношению к поражаемыми растительным объектам [1].

В связи с этим, актуальным становится вопрос об идентификации и дифференциации патогенных штаммов *X. campestris*. Особый интерес это представляет в условиях Саратовской области, территория которой характеризуется присутствием практически всех почвенно-климатических зон [2]. Это послужило обоснованием при выборе метода дифференциации – биохимического тестирования – так как разные почвенные условия требуют от бактерий приспособления к ним и, как следствия, изменения своих биохимических характеристик.

Цель работы – дифференциация культур *X. campestris*, полученных из разных районов Саратовской области

В соответствии с целью, были поставлены задачи по: получению и идентификации «диких» образцов возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных, уточнению их биохимических характеристик и их сравнению с музейным штаммом возбудителя и наиболее распространёнными в природе микроорганизмами.

Материалы и методы

В качестве рабочего материала использовались культуры «диких» штаммов X. campestris (pv. campestris), полученные из поражённых сосудистым бактериозом крестоцветных растений капусты белокочанной, выращенных в Саратовском, Энгельсском и Вольском районах Саратовской области. Для каждого из районов отбиралось шесть образцов.

Выявление поражения растений. сосудистым бактериозом проводилось методом дот-иммуноанализа (ДИА) с применением специфичной гипериммунной кроличьей сыворотки [3].

Культуры возбудителя получались высевом растительных экстрактов на МПА по методу Дригальского с последующим пересевом целевых колоний на среду Эйкмана.

Для контроля результатов ДИА использовалась культура штамма X. campestris B 610 (NCPPB 45), полученного из коллекции ризосферных бактерий ИБФРМ РАН.

В биохимическом тестировании использовались образцы культур Pseudomonas aeruginosa ATCC-9027 (*P. aeruginosa*) (получен из ВКПМ ФГУП ГосНИИГенетика), *Yersinia pseudotuberculosis* III (*Y. pseudotuberculosis*), *Yersinia enterocolitica* 66–82 (O:3) (*Y. enterocolitica*), *Escherichia coli* 1027 (*E. coli*) (получены из ГКПМ ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), *X. campestris* B 610 (NCPPB 45) (получен из коллекции ризосферных бактерий ИБФРМ РАН). Исследование проводилось с применением тест-системы API-10S (Bio-Mérieux, Франция), в трёхкратной повторности [4].

Процедуру анализа выполняли в соответствии с изложенной в инструкции стандартной методикой. Результаты анализа учитывали визуально, непосредственно и после добавления соответствующих реактивов, на входящих в комплект тест-системы стандартизированных бланках. Для интерпретации результатов каждому из исследуемых штаммов по результатам реакции присваивали соответствующий числовой профиль, который затем соотносили с базой данных системы.

Результаты и обсуждение

Результаты ДИА для образцов «диких» штаммов представлены в таблице 1. Из её данных видно, что популяция микроорганизмов, полученных из разных районов, не однородна по своему составу и взаимодействует со специфичной сывороткой по-разному. Это позволяет говорить о развитой приспособительной способности возбудителя и является достаточным основанием для уточнения их биохимических характеристик.

Таблица 1 – Результаты проведения дот-иммуноанализа с образцами чистых культур *X. campestris*, взятых в различных районах Саратовской области

Образец	Разведение образца		
	1:1	1:10	1:100
Вольский р-н			
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	-	+
4	+	+	-
5	-	-	-
6	+	+	+
Саратовский р-н			
1	+	+	+
2	+	+	-
3	-	-	-
4	+	+	+
5	+	+	-
6	+	+	-
Энгельсский р-н			
1	-	-	-
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	-	-
5	+	-	+
6	+	-	-

Результаты биохимического тестирования и сравнения штаммов *X. campestris* представлены в таблице 2. Из неё видно, что микроорганизмы вида *X. campestris* значительно отличаются по своим характеристикам не только от наиболее часто встречающихся в природе микроорганизмов, но и между собой – о чём свидетельствуют их различные числовые профили. При этом числовой профиль одного из штаммов совпадает с таковыми для других видов микроорганизмов – не участвовавших в исследовании, но присутствующих в базе данных тест-системы API-10S

Более полно различия между «дикими» штаммами X. campestris и их отличия от музейного штамма представлены в таблице 3.

Из таблицы видно, что штаммы возбудителя, полученные из разных регионов Саратовской области, в целом совпадая по биохимическим признакам с музейным, имеют отдельные отличия, обусловленные различиями среды обитания. Характерным является отсутствие у «диких» штаммов возбудителя способности к продукции сероводорода – что, вероятно, связано с особенностями условий хранения музейного штамма.

Таблица 2 – Сравнение числовых профилей системы API 10S, характерных для диких штаммов X. campestris и наиболее распространённых в природе микроорганизмов

Вид штамма	Наименование	Числовой профиль	Совпадение профилей
coli	М-616	7305	*coli* 1
coli	1027	7345	-
enterocolitica ser. 0:3	66–82	0210	-
pseudotuberculosis	III	7420	-
enterica subsp. Entericaser. Abony	М-767	7755	-
Proteus sp	-	6775	-
campestris	В-610	7010	-
campestris	*pv. campestris* 1	7004	*Echerichia vulneris, Pantoea sp, Echerichia coli* 2
campestris	*pv. campestris* 2	7044	-
campestris	*pv. campestris* 3	7000	-
campestris	*pv. campestris* 4	7000	-

Таблица 3 – Числовые профили системы API 10S, характерные для «диких» штаммов *X. Campestris pv. campestris*

Штамм	Источник получения	Числовой профиль	Отличия от музейного штамма
campestrispv. campestris 1	Саратовская обл., Вольский р-н	7004	Восстановление нитратов, отсутствие продукции H_2 S
campestrispv. campestris 2	Саратовская обл., г. Энгельс	7044	Триптофандеаминаза, восстановление нитратов, отсутствие продукции H_2S
campestris pv. campestris 3,4	Саратовская обл., г. Саратов, Кировский р-н	7000	Отсутствие продукции H_2S

Заключение

Являющийся опаснейшим для культурной флоры заболеванием, сосудистый бактериоз крестоцветных распространён повсеместно. Это способствует широкой изменчивости его возбудителя и, как следствие, различиям в патогенности и специфичности – что вызывает интерес к дифференциации и систематизации его патоваров.

В ходе исследования было установлено, что на территории Саратовской области присутствует как минимум три «диких» штамма возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных. Показано, что эти патовары отличаются по основным биохимическим показателям как друг от друга, так и от музейного образца. При этом, наблюдается подобие одного из «диких» штаммов сразу нескольким видам неблизкородственной им естественной микрофлоры. Это позволяет утверждать о широких пределах видовой изменчивости возбудителя – и, как следствие, разнообразии его вариантов. Однако, для возможности практического применения дифференциация и систематизация патоваров должна проводится более широким набором методов и по большему количеству критериев.

Литература

1. Ignatov, A. Genetic diversity in populations of Xanthomonas campestris pv. campestris in cruciferous weeds in central Coastal California / A. Ignatov, A. Sechler, E.L. Schuenzel [и др.] // Phytopathology. – 2007. – V. 97. – P.803–812.2. Казулин

2. Проект концепции развития агропромышленного комплекса Саратовской области до 2020 года [Электронный ресурс] // Министерство сельского хозяйства Саратовской области. Официальный портал. – Режим доступа: https://www.minagro.saratov.gov.ru/Razvitie/ (дата обращения 14.06.2023).

3. Пат. RU2736806, G01N33/53. Способ диагностики сосудистого бактериоза крестоцветных методом дот-иммуноанализа / М.А. Кузнецов, А.А. Щербаков, В.М. Скорляков [и др.]. – № 2019108525; заявл. 25.03.2019; опубл. 20.11.2020, Бюл. № 32.

4. Червякова, Н.С. Оптимизация подходов к установлению аутентичности консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов / Дисс… канд. биол. наук. 06.01.11 / Червякова Надежда Сергеевна. – Саратов. – 2017. – 177 с.

 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-2-56-60

УДК 544.478.3

ЭЛЕКТРОАКТИВНЫЕ ПОЛИМЕР-ОСНОВАННЫЕ КОМПОЗИТЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОМАТЕРИАЛА В БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ

С.В. Алферов, В.В. Федина

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Введение

Биотопливные элементы на основе иммобилизованных микроорганизмов (БТЭ) и их ферментных систем перспективны для решения целого ряда экологических проблем благодаря своей уникальной способности одновременно вырабатывать энергию и утилизировать загрязнители [1–3].

Интенсивный прогресс в развитии биотехнологий, нанотехнологий, наноматериалов и проводящих полимерных композитов позволил выйти на новый уровень исследований в области процессов биоэлектрокатализа для создания БТЭ и их миниатюризации [4, 5].

Стоит особо отметить, что методы иммобилизации биокатализаторов на поверхности электродов играют важную роль в эффективности работы биотопливных элементов. Внеклеточный перенос электронов от ферментных систем микроорганизмов на электрод может быть организован используя редокс-активные или электропроводящие гидрогели на основе природных или синтетических полимеров и углеродных наноматериалов [6, 7]. В качестве полимеров, изначально не обладающих электрической активностью, но способных образовывать биосовместимые гидрогели, применяемые для иммобилизации микроорганизмов и их ферментных систем в том числе в биоэлектрокатализе используются хитозан [8], бычий сывороточный альбумин [9] и поливиниловый спирт (ПВС) [10, 11].

Как правило, полимерная основа в таких композитах не обладает электроактивностью, поэтому для придания ей электропроводности используют проводящие наноматериалы [12]. Волокнистые углеродные материалы, к которым относятся углеродные нанотрубки (УНТ) и нановолокна, являются одним из наиболее перспективных объектов для создания проводящих матриц [8]. Было показано, что УНТ особенно подходят для установления электронных связей с активными центрами ферментов, поскольку имеют диаметр от одного до нескольких десятков нанометров. Таким образом, биокатализаторы могут эффективно осуществлять либо прямой перенос электронов на электрод, либо опосредованный электронными челноками, которые служат промежуточными звеньями для переноса электронов [13, 14]. Гидрогели на основе полимерных композитов с наноматериалами значительно повышают энергетические характеристики БТЭ [8].

Ферменты, выделенные из уксуснокислых бактерий и целые бактериальные клетки, были ранее использованы для создания БТЭ [5, 6]. Таким образом, мембранные фракции уксуснокислых бактерий можно рассматривать как природные мультиферментные системы для эффективного окисления сахаров, полиолов и спиртов в БТЭ.

Цель работы – разработка перспективных нанокомпозитных материалов на основе проводящих полимерных гидрогелей с иммобилизованным биокатализатором – мембранно-связанными ферментными системами (мембранными фракциями) уксуснокислых бактерий Gluconobacter oxydans в биоэлектрохимических системах БТЭ.

Материалы и методы

В работе использовали бактерии Gluconobacter oxydans subsp. industrius (ВКМ В-1280) (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ИБФМ РАН). Культивирование бактерий проводили на питательной среде, следующего состава: D-сорбит – 200 г./л; дрожжевой экстракт – 20 г./л; дистиллированная вода – 100 мл, pH среды – 5,2–5,5, при температуре 28 °C, в течение 18–20 часов. После культивирования клетки собирали центрифугированием 10 мин. (10000 g) и отмывали двукратно 20 мМ натрий-фосфатным буфером с pH 6,0. Осажденные клетки ресуспендировали в свежем буферном растворе и разрушали на ультразвуковом процессоре Qsonica (Q125) в течение 40 минут при амплитуде 80 %. Затем разрушенные клетки центрифугировали при 4 °C в течение 40 минут (5000 g) для осаждения крупного клеточного дебриса. Полученный лизат центрифугировали на центрифуге Beckman Coulter Avanti J-30I при 4 °C в течение 40 минут (101000 g) для осаждения мембранной фракции клеток Gluconobacter oxydans. Мембранные фракции хранились при температуре -18 °C.

Многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) были получены при 630 °C из смеси пропан-бутана с использованием катализатора Co/Mo/Mg/Al [15]. MWCNT окисляли в 37 % парах пероксида водорода при 120 °C в течение 10 ч по методике, описанной в работе [16]. Многостенные углеродные нанотрубки были любезно предоставлены ООО «Нанотехцентр» (г. Тамбов, Россия).

Морфологию поверхности образцов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы исходных полимеров, полимеров с окисленными МУНТ, полимеров с окисленными МУНТ и мембранной фракции G. oxydans фиксировали при 4 °C в течение 12 ч в 0,05 М натрий какодилатном буфере (pH 6,8), содержащем 1,5 % глутарового альдегида, и затем постфиксировали при 20 °C в течение 3 ч в том же буфере с добавлением 1 % OsO_4. Образцы после обезвоживания покрывали золотом (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, Токио, Япония) и исследовали на сканирующем микроскопе JSM-6510LV (JEOL, Токио, Япония). Сканирующая электронная микроскопия проводилась в ЦКП Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Ячейка биотопливного элемента представляла собой две взаимосвязанных кюветы, объём анодного отделения был равен объему катодного и составлял 3 мл. Электродами служили графитовые стержни диаметром 8 мм, площадь рабочей поверхности электродов составляла 300 мм^2. Высота погружения электродов в раствор – 10 мм. Камеры разделяли протонселективной мембраной МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург, Россия).

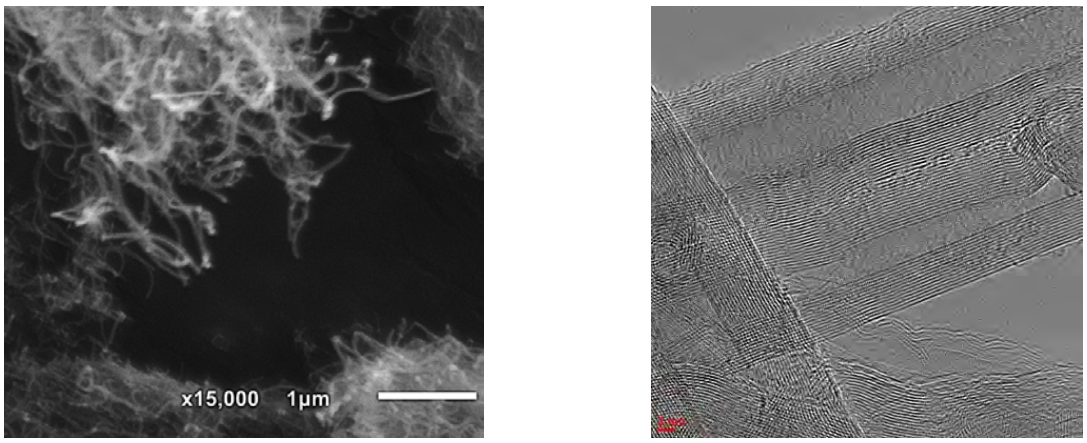
В качестве фонового раствора использовали 30 мМ натрий-фосфатный буфер pH=6,0, в качестве субстрата биоокисления использовали глюкозу с концентрацией в кювете 10 мМ. В анодном пространстве использовался медиатор 2,6 – дихлорфенолиндофенол, в катодном пространстве гексацианоферрат (III) калия.

Измерения потенциала проводили с помощью потенциостата Coretest CS120 ("Coretest", КНР). Оценку электрических характеристик производили после достижения стационарного значения генерируемого потенциала. Измеряемым параметром в процессе биокаталитического окисления субстрата в режиме генерации потенциала являлась величина разности потенциалов за время проведения эксперимента.

Результаты и обсуждение

В качестве наполнителя для формирования проводящих гидрогелей использовались многостенные углеродные нанотрубки, полученные синтезом из пропан-бутановой смеси в присутствии катализаторов на основе оксидов металлов (Co/Mo/Mg/Al) и окисленные в парах пероксида водорода (МУНТок). Окисление в парах перекиси водорода обеспечивает образование кислородсодержащих групп на поверхности МУНТок без увеличения степени дефектности [16].

СЭМ и ПЭМ изображения МУНТок приведены на рис. 1. Внешний диаметр нанотрубок варьируется в диапазоне 15–30 нм.

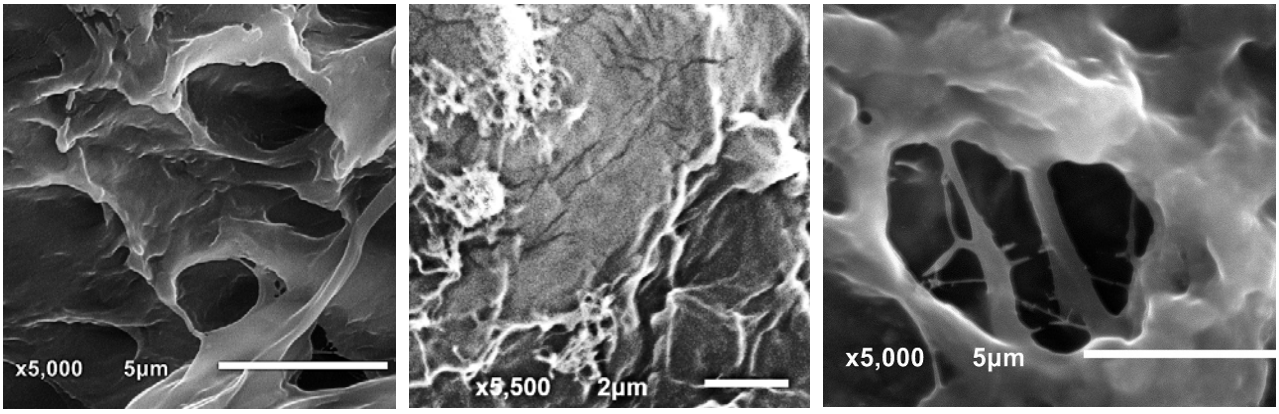


(а) (б)

Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия (а) и просвечивающая электронная микроскопия (б) многостенных углеродных нанотрубок, используемых в работе

Диаметр внутреннего канала составляет 4–8 нм, длина – более 2 мкм, количество графеновых слоев варьируется от 8 до 20. Удельная площадь поверхности (по данным БЭТ-анализа) составляет 260 $м^2/г$.

Для определения характеристик проводящих композитов на основе полимерных гидрогелей использовался метод СЭМ. Изображения исходного гидрогеля поливинилового спирта, модифицированного n-винилпирролидоном (А), композита ПВС-ВП/МУНТок (Б), и ПВС-ВП/МУНТок/мембранная фракция бактерий G. oxydans (В) приведены на рис. 2. Синтетический полимер ПВС-ВП образует гидрогели с размером пор 3–10 мкм (рис. 2А).

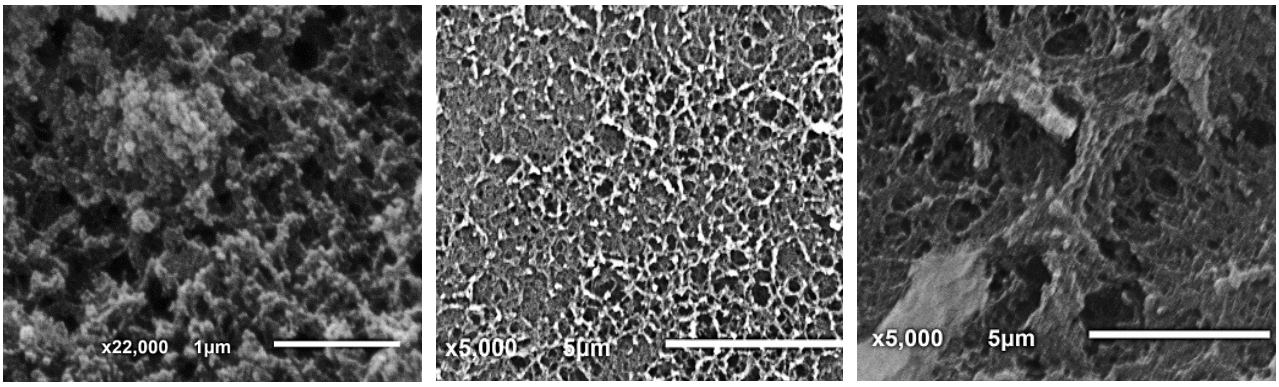


(а) (б) (в)

Рисунок 2. Сканирующая электронная микроскопия исходного гидрогеля поливинилового спирта, модифицированного n-винилпирролидоном (а), композита ПВС-ВП/МУНТок (б), и ПВС-ВП/МУНТок/мембранная фракция бактерий *G. oxydans* (в)

Распределение нанотрубок в гидрогеле ПВС-ВП неравномерно (рис. 2Б), в некоторых местах наблюдается явное образование конгломератов. Это связано с высокой гидрофильностью полимерной матрицы при отсутствии в полимере катионных групп для электростатического взаимодействия с МУНТок. Структура гидрогеля с диаметром пор 2–5 мкм сохраняется при последующем добавлении мембранных фракций бактерий G. oxydans (рис. 2В), кроме того, на отдельных участках структуры нанокомпозита визуализируются одиночные нанотрубки.

Изображения исходного гидрогеля бычьего сывороточного альбумина (А), композита БСА/МУНТок (Б), и БСА/МУНТок/мембранная фракция бактерий G. oxydans (В) приведены на рис. 3.



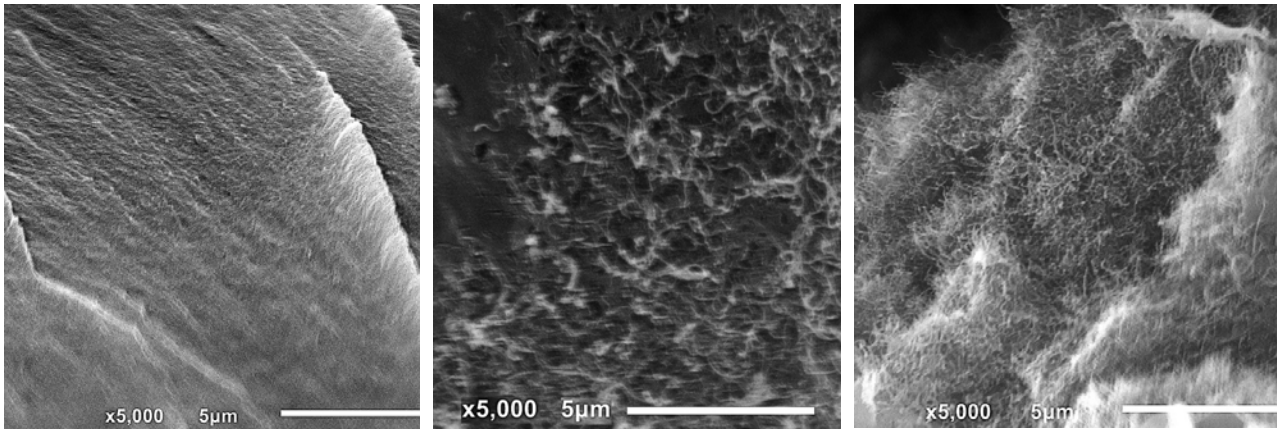
(а) (б) (в)

Рисунок 3. Сканирующая электронная микроскопия исходного гидрогеля бычьего сывороточного альбумина (а), композита БСА/МУНТок (б), и БСА/МУНТок/мембранная фракция бактерий *G. oxydans* (в)

БСА формирует пленку с диаметром пор 1–5 мкм (рис. 3А). Добавление МУНТок к БСА приводит к образованию упорядоченной сетчатой структуры с диаметром пор менее 1 мкм (рис. 3Б). При этом углеродные нанотрубки не визуализируются в свободном виде. Предполагается, что БСА формирует

белковую пленку на поверхности МУНТ, ключевую роль в формировании таких структур играют гидрофобные взаимодействия между графеновой поверхностью углеродных нанотрубок и участками белка, обладающими высокой плотностью гидрофобных остатков. Подобное проведение было продемонстрировано ранее для карбоксилированных МУНТ и БСА [17]. При добавлении мембранных структур бактерий в композит БСА/МУНТок происходит значительная дестабилизация упорядоченной структуры и образование пор размером от 2 до 6 мкм (рис. 3В). Присутствие дифильных мембранных липидов бактериальных структур приводит к нарушению гидрофобных взаимодействий между белком и МУНТок. Тем не менее можно ожидать, что белковая оболочка БСА на поверхности МУНТок в нанокомпозитах будет препятствовать эффективному переносу электронов с активных центров ферментов на электрод БТЭ при участии МУНТок.

Изображения исходного гидрогеля хитозана (А), композита Хитозан/МУНТок (Б), и Хитозан/МУНТок/мембранная фракция бактерий G. oxydans (В) приведены на рис. 4.



(а) (б) (в)

Рисунок 4. Сканирующая электронная микроскопия исходного гидрогеля хитозана (а), композита Хитозан/МУНТок (б), и Хитозан/МУНТок/мембранная фракция бактерий G. oxydans (в)

Полимерная матрица на основе хитозана образует гомогенный гидрогель (рис. 4А), В присутствии МУНТок в гидрогеле хитозана формируется структура с упорядоченным равномерным распределением нанотрубок по всему объему нанокомпозита (рис. 4Б). Присутствие бактериальных мембранных структур не оказывает существенного влияния на структуру нанокомпозита (рис. 4В).

Все 3 проводящих биокомпозита на основе полимерных гидрогелей были использованы для формирования биоанодов в модели БТЭ. Полученные значения энергетических характеристик моделей БТЭ приведены в таблице 1.

Таблица 1. Значения энергетических параметром микробного БТЭ при использовании различных электроактивных композитов

Параметр	ПВС-ВП/МУНТок/МФ	БСА/МУНТок/МФ	Хитозан/МУНТок/МФ
Генерируемый потенциал, мВ	114 ± 3	164 ± 3	176 ± 9
Удельная мощность, Вт	$0{,}74*10^{-3}$	$0{,}63*10^{-7}$	$1{,}39*10^{-7}$
Внутреннее сопротивление, кОм	5,1	10	9

Наиболее высокие значения энергетических характеристик были достигнуты в БТЭ где при формировании биоанода использовался электроактивный нанокомпозит на основе гидрогеля хитозана. Удельная мощность такого БТЭ в 2 раза превышает значения, зафиксированные для БТЭ с использованием других нанокомпозитов. Не смотря на достаточно высокий генерируемый потенциал при использовании БСА, пленка нанокомпозита склонна к быстрому разрушению, что делает невозможным повторное использования такого биоанода. Таким образом нанокомпозит на основе гидрогеля хитозана в композиции с окисленными МУНТ является наиболее перспективным материалом для иммобилизации биокатализаторов при создании биоэлектрохимических систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021–0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Литература

1. Rossi, R.; Logan, B.E. Impact of Reactor Configuration on Pilot-Scale Microbial Fuel Cell Performance. Water Res. **2022**, 225, 119179. DOI:10.1016/j.watres.2022.119179.

2. Varjani, S. Prospective Review on Bioelectrochemical Systems for Wastewater Treatment: Achievements, Hindrances and Role in Sustainable Environment. Sci. Total Environ. **2022**, 841, 156691. DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.156691.

3. Wang, J.; Ren, K.; Zhu, Y.; Huang, J.; Liu, S. A Review of Recent Advances in Microbial Fuel Cells: Preparation, Operation, and Application. BioTech. **2022**, 11, 44. DOI:10.3390/biotech11040044.

4. Tang, J.; Yan, X.; Engelbrekt, C.; Ulstrup, J.; Magner, E.; Xiao, X.; Zhang, J. Development of Graphene-Based Enzymatic Biofuel Cells: A Minireview. Bioelectrochemistry **2020**, 134, 107537. DOI:10.1016/j.bioelechem.2020.107537.

5. Buaki-Sogó, M.; García-Carmona, L.; Gil-Agustí, M.; Zubizarreta, L.; García-Pellicer, M.; Quijano-López, A. Enzymatic Glucose-Based Bio-Batteries: Bioenergy to Fuel Next-Generation Devices. Top. Curr. Chem. **2020**, 378, 49. DOI:10.1007/s41061–020–00312–8.

6. Pankratova, G.; Gorton, L. Electrochemical Communication between Living Cells and Conductive Surfaces. Curr. Opin. Electrochem. **2017**, 5, 193–202. DOI:10.1016/j.coelec.2017.09.013.

7. Taghizadeh, A.; Taghizadeh, M.; Jouyandeh, M.; Yazdi, M.K.; Zarrintaj, P.; Saeb, M.R.; Lima, E.C.; Gupta, V.K. Conductive Polymers in Water Treatment: A Review. J. Mol. Liq. **2020**, 312, 113447. DOI:10.1016/j.molliq.2020.113447.

8. Plekhanova, Y.; Tarasov, S.; Kolesov, V.; Kuznetsova, I.; Signore, M.; Quaranta, F.; Reshetilov, A. Effects of Polymer Matrices and Carbon Nanotubes on the Generation of Electric Energy in a Microbial Fuel Cell. Membranes **2018**, 8, 99. DOI:10.3390/membranes8040099.

9. Jahanban-Esfahlan, A.; Roufegarinejad, L.; Jahanban-Esfahlan, R.; Tabibiazar, M.; Amarowicz, R. Latest Developments in the Detection and Separation of Bovine Serum Albumin Using Molecularly Imprinted Polymers. Talanta **2020**, 207, 120317. DOI:10.1016/j.talanta.2019.120317.

10. Arlyapov, V.A.; Yudina, N. Yu.; Asulyan, L.D.; Alferov, S.V.; Alferov, V.A.; Reshetilov, A.N. BOD Biosensor Based on the Yeast Debaryomyces Hansenii Immobilized in Poly(Vinyl Alcohol) Modified by N-Vinylpyrrolidone. Enzym. Microb. Technol. **2013**, 53, 257–262. DOI:10.1016/j.enzmictec.2013.05.004.

11. Alferov, S.V.; Arlyapov, V.A.; Alferov, V.A.; Reshetilov, A.N. Biofuel Cell Based on Bacteria of the Genus Gluconobacter as a Sensor for Express Analysis of Biochemical Oxygen Demand. Appl. Biochem. Microbiol. **2018**, 54, 689–694. DOI:10.1134/S0003683818060029.

12. Eivazzadeh-Keihan, R.; Bahojb Noruzi, E.; Chidar, E.; Jafari, M.; Davoodi, F.; Kashtiaray, A.; Ghafori Gorab, M.; Masoud Hashemi, S.; Javanshir, S.; Ahangari Cohan, R.; et al. Applications of Carbon-Based Conductive Nanomaterials in Biosensors. Chem. Eng. J. **2022**, 442, 136183. DOI:10.1016/j.cej.2022.136183.

13. Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. Carbon Nanotube/Enzyme Biofuel Cells. Electrochim. Acta. **2012**, 82, 179–190. DOI:10.1016/j.electacta.2011.12.135.

14. Kharkova, A.; Arlyapov, V.; Medvedeva, A.; Lepikash, R.; Melnikov, P.; Reshetilov, A. Mediator Microbial Biosensor Analyzers for Rapid Determination of Surface Water Toxicity. Sensors. **2022**, 22, 8522. DOI:10.3390/s22218522.

15. Peters, B.; Mientus, M.; Kostner, D.; Junker, A.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. Characterization of Membrane-Bound Dehydrogenases from Gluconobacter Oxydans 621H via Whole-Cell Activity Assays Using Multideletion Strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. **2013**, 97, 6397–6412. DOI:10.1007/s00253–013–4824-y.

16. Dyachkova, T.P.; Khan, Y.A.; Orlova, N.V.; Kondrashov, S.V. Oxidation of Multiwalled Carbon Nanotubes by Hydrogene Peroxide Vapor: Laws and Effects. Vestnik **2016**, 22, 323–333. DOI:10.17277/vestnik.2016.02.pp.323–333.

17. Lou, K.; Zhu, Z.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wang, X.; Cao, J. Comprehensive Studies on the Nature of Interaction between Carboxylated Multi-Walled Carbon Nanotubes and Bovine Serum Albumin. Chem. Biol. Interact. **2016**, 243, 54–61. DOI:10.1016/j.cbi.2015.11.020.

Уважаемые коллеги!
Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам XI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» за ваш труд в определении основных проблем в области биотехнологии и выявлении тенденций развития в данной области, за обмен достижениями биотехнологии и обсуждение путей оптимизации образовательного процесса студентов-биотехнологов. Желаем вам творческих успехов, больших научных достижений и побед!

До новых встреч!

С уважением, оргкомитет.

Организаторы:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Воронежский государственный университет инженерных технологий»,
Научно-образовательный центр «НаноБиоТех»,
ООО «Вега-Эко»,
ООО «Биоактуаль»

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

журнала ***«Актуальная биотехнология»***

Приглашает к публикации студентов, аспирантов и научных работников по следующим тематикам:

- *Актуальные вопросы современной биотехнологии*
- *Биоинженерия и биоинформатика*
- *Экология и ресурсосбережение*
- *Биоэнергетика, пищевая биотехнология, биохимия, биогеотехнология*
- *Сельскохозяйственная и лесная биотехнология*
- *Биофармацевтика и биомедицина*

Требования к оформлению статей

1. Материалы представляются в двух видах: на электронном носителе и распечатанные на одной стороне листа белой бумаги формата А4 (1 экз.) на лазерном принтере. Они должны быть набраны в редакторе MSWord версия не ниже 6.0 (Office не выше 2007) и напечатаны через одинарный интервал в две колонки шрифтом:
• основной текст –TimesNewRomanCyr 11 с полями: левое 22 мм, правое 18 мм, верхнее и нижнее 25 мм;
• колонтитулы от края – верхний и нижний 18 мм;
• заголовки по центру –TimesNewRomanCyr 11, жирный;
• красная строка -1 см;
• перенос слов – автоматический.
Со смещением на 5 см от рамки текста в начале статьи набираются:
• УДК– Times New Roman Cyr 12;
• должность, степень И. О. Ф. авторов –TimesNewRomanCyr 12;
• название статьи –TimesNewRomanCyr 16, жирный, строчной (без переноса);
• аннотации– Times New Roman Cyr 9;
• ключевые слова – TimesNewRomanCyr 9, до 10 слов;
2. Объем для статьи – 3-8 с. Структурно статья должна иметь четко выраженное *введение,* в котором ставится задача (описывается решаемая проблема), *основную часть,* где излагаются используемые авторами пути решения поставленной задачи, приводятся и обсуждаются результаты, и *заключение,* в сжатой форме подводящее итог работы. Повторение одних и тех же данных в статье, таблице и графике не допускается. Размерность всех характеристик приводится в системе СИ.
3. К каждой статье под заглавием дается аннотация (объем до 600 печатных знаков) на русском и английском языках через 1 строку друг от друга. Название статьи, фамилия и инициалы приводятся отдельно на английском языке.
4. Название статьи или краткого сообщения должно быть лаконичным и точно отражать содержание.
5. Иллюстрации в формате jpeg или gif:
должны быть расположены после ссылки на них в тексте;
должны выполняться на компьютере с обозначением всех необходимых букв и символов в соответствии с ЕСКД и Р 50-77-80. Все буквенные и цифровые обозначения, приведенные на рисунках, поясняются в основном или подрисуночном тексте. Подрисуночные подписи даются TimesNewCyr 10, на формат рисунка.
Графические объекты (диаграммы, графики) должны быть активными (т.е. подлежать редактированию стандартными средствами, например, MSExcel).
6. Формулы и буквенные обозначения:
×буквы латинского алфавита, используемые в индексах, набирают курсивом;
×буквы русского и греческого алфавита – прямым шрифтом; знак вектора – полужирным;
×нумерация формул в тексте сквозная. Нумеруются только те формулы, на которые есть ссылки в тексте.
Формат формул (стандартный редактор) :
× стиль –«математический»;
× размер символа —11

Sizes (Размеры)	
Full (Обычный)	11 – 10
Subscript/Superscript(Крупныйиндекс)	7
Sub-subscript/Superscript (Мелкийиндекс)	5
Symbol (Крупный символ)	12
Subsymbol (Мелкий символ)	9

7. Таблицы (слово печатается вразрядку) должны быть с заголовками и обязательно располагаться после ссылки на них в тексте. Графы в таблицах должны иметь краткие заголовки. Упоминаемые в заголовках величины сопровождаются соответствующими единицами измерений.
8. Литература (слово печатается:TimesNewRomanCyr 11, жирный, прописной) включает источники, использованные автором при написании статьи, и должна содержать не более 10 наименований. Ссылки в тексте даются в квадратных скобках: [1], помещаются в конце статьи и оформляются согласно ГОСТ 7.1-2003.

В журнале публикуются оригинальные научные статьи теоретического и экспериментального характера. Автор указывает рубрику (в сопроводительном письме), в которой он хотел бы разместить свою статью:

Статья должна быть тщательно проверена и подписана всеми авторами.

На отдельном листе авторы указывают название статьи на русском и английском языке, ФИО полностью, адрес, ученую степень, должность, место работы, контактный телефон, e-mail, а также отмечают автора для переписки.

К статье должны прилагаться сопроводительные документы:

– сопроводительное письмо;

– выписка из протокола заседания кафедры (лаборатории) с рекомендацией статьи к печати;

– положительная рецензия ведущего ученого в данной области или члена редакционной коллегии, заверенная подписью и печатью.

•