1. Баранов В.С. Генетический паспорт. Кому и зачем он нужен? [Электронный ресурс] // EUROLAB - 2019. - № 2. URL: https://www.eurolab-portal.ru/

2. Сазонова, П.А. Реализация генетической паспортизации в Российской Федерации: правовые и этические аспекты / П. А. Сазонова. // Молодой ученый. – 2020. - № 20. – С. 319-320.

3. Попова О.В. Генетический паспорт человека и возможности его получения гражданами России / О. П. Попова // Право и государство: теория и практика. - 2019. - № 7. – 14 – С. 19.

4. Дейкин А.В. ДНК-паспортизация - возможности и риски /А.В .Дейкин // Коммерсантъ Наука. - 2019. - №23. – С. 12.

5. Селюкова С.А. Использование генетической информации: перспективы и риски / А.С. Селюкова // Образование и наука в России и за рубежом. – 2018. - №13. – С. 73 – 76.

УДК 577.24

Яковлева Е.А., Десятова М.А., Сичкар Д.А., Макеев О.Г.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КАК ЭТАП РАЗРАБОТКИ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий клеточной и генной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

Yakovleva E.A., Desyatova M.A., Sichkar D.A., Makeev O.G.

MODELING OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN CELL CULTURE AS A STAGE IN THE DEVELOPMENT OF A MODEL SYSTEM FOR STUDYING NEURODEGENERATIVE DISEASES

Department of Medical Biology and Genetics
Ural State Medical University
Laboratory of cellular therapy and gen-technology
Institute of Medical Cell Technologies
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В статье обоснована необходимость разработки модельной клеточной линии для исследования нейродегенеративных заболеваний; определена допустимая пороговая концентрация ингибитора дыхательной цепи

переноса электронов, индуцирующая митоходриальную дисфункцию в клетках линии «ЛЭЧ 3-81».

Annotation. The article substantiates the need to develop a model cell line for the study of neurodegenerative diseases; the permissible threshold concentration of the inhibitor of the respiratory electron transport chain, which induces mitochondrial dysfunction in LECh 3-81 cells, was determined.

Ключевые слова: Болезнь Альцгеймера, митохондрии, цепь переноса электронов.

Keywords: Alzheimer's disease, mitochondria, electron transport chain.

Введение

Нейродегенеративные заболевания (НДГЗ) представлены различными нозологическими формами, такими как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, хорея Гентингтона, однако общими чертами для всех заболеваний этой группы является прогрессирующая дегенерация и гибель нейронов в различных областях ЦНС, приводящая к нарушению связи между ее структурами, дисбалансу в синтезе и выделении соответствующих нейромедиаторов и, как следствие, формированию нарушений в когнитивной, двигательной и мыслительной сферах. Наиболее грозное клиническое проявление НДГЗ – деменция, которой, по данным ВОЗ, на данный момент страдает порядка 50 миллионов человек, и, по прогнозам, прирост в будущем составит порядка 10 миллионов новых случаев ежегодно. Значительный вклад в статистику вносит болезнь Альцгеймера (БА), (60-70% всех случаев НДГЗ), ведущими морфологическими признаками которой являются отложения внеклеточных β-амилоидных бляшек и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков гиперфосфорилированного тау-белка. В настоящее время существует две основные гипотезы этиопатогенеза БА – «амилоидного каскада» и «митохондриального». Несмотря на противоречивые данные литературы [2] о первичности или вторичности роли митохондриальной патологии, структурно-функциональные изменения митоходрий вносят значительный вклад в развитие болезни Альцгеймера. Так, у пациентов с БА регистрируется пониженная активность белковых комплексов дыхательной цепи, в частности, комплекса I и комплекса IV, в тканях головного мозга при аутопсии, а также других клетках, включая тромбоциты [3]. Также наблюдается нарушение митохондриального мембранного потенциала; повышенная генерация активных форм кислорода (АФК), способная еще больше усугублять дисфункцию митохондрий посредством окислительного повреждения кольцевой молекулы мтДНК [4].

Несмотря на знание определенных моментов патогенеза, в настоящее время не существует специфического этиологического и патогенетического лечения БА. Основные причины – отсутствие четких

связей между звеньями. Необходимо более детальное изучение патологического процесса и метаболических каскадов нейродегенерации на клеточном, субклеточном и молекулярных уровнях. Существующие модели изучения БА на лабораторных животных [2, 4] помогают лучше понять механизмы нейродегенерации как комплексного процесса и роль митохондриальной дисфункции в частности. Например, ингибирование комплексов дыхательной цепи переноса электронов ротеноном (ингибитор комплекса I) и азидом натрия (ингибитор цитохромоксидазы) [4] способствуют накоплению патологических амилоидогенных производных в тканях головного мозга мышей. Однако остается необходимость в прицельном взгляде на внутриклеточные аспекты патогенеза, в том числе с целью разработки подходов к специфической терапии. Именно поэтому создание модельной клеточной линии представляется актуальной задачей в рамках исследования БА. Возможный путь реализации данной задачи – использование химических агентов с целью моделирования митохондриальной дисфункции в клетках. Наиболее перспективной мишенью представляется элетрон-транспортная цепь, ответственная за генерацию АФК.

Цель исследования – определение концентрации ингибитора белковых комплексов электрон-транспортной цепи в рамках моделирования митохондриальной дисфункции в клеточной культуре как этапа разработки модельной системы для изучения нейродегенеративных заболеваний.

Материалы и методы исследования

Для реализации поставленной цели была выбрана культура клеток ЛЭЧ 3-81, полученная из ФБУН «Екатеринбургский научно – исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Условия хранения культуры клеток: - 85ºС, в криохранилище.

Культивирование проводили в стандартных условиях и по стандартным протоколам с использованием культуральной среды DMEM/Ham F-12 (SigmaAldrich, США) с 10% фетальной бычьей сыворотки (SigmaAldrich, США), с соблюдением всех необходимых требований асептики и антисептики, в условиях чистых помещений с постоянным макро- и микроскопическим контролем отсутствия контаминации. Культивирование клеток проводили в стерильных ламинарных боксах с использованием инкубатора (Sanyo, Япония) с оптимальными температурными (37ºС), газовыми (с 5% CO2) и влажностными (95%) характеристиками.

По достижении необходимой клеточной массы из флакона удаляли культуральную среду, и промывали клетки раствором фосфатно-солевого буфера. Далее во флакон добавляли раствор трипсин-ЭДТА 0,25% объемом 10 мл. Убедившись, что клетки открепились, переводили из монослоя в

суспензию, переносили в центрифужную пробирку, центрифугировали 5 мин при 200G. Удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 2 мл полной питательной среды и считали количество клеток с помощью камеры Горяева. Готовили суспензию 1 млн клеток в 10 мл полной питательной среды, и переносили клетки в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл клеточной суспензии на лунку (104 клеток в каждой лунке), помещали в CO2-инкубатор.

В качестве ингибитора дыхательной цепи был выбран изофлавоноид ротенон концентрации 5 мкМ, инициирующий, по данным литературы [4], снижение активности НАД-Н дегидрогеназы в ЦПЭ митохондрий. После 24 часов культивирования к культуре клеток ЛЭЧ-3-81 методом растительной добавляли различные концентрации химического агента. Исследуемые концентрации представлены в таблице 1. Каждую концентрацию выполняли в восьми повторностях. В контрольные лунки химическое соединение не добавлялось. Конечный объем среды в лунке составлял 200 мкл. Планшет с внесенным препаратом помещался в CO2-инкубатор на 24 часа.

Таблица 1

Исследуемые концентрации

Исследуемая концентрация ротенона, мкМ	5	2.5	1,25	0,625	0,3125	0,156	0,078	0,039	0,0195	0,00975	к
Количество повторностей	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

На следующий день проводили исследование уровня активности митохондриальных дегидрогеназ методом МТТ теста (Sigma Aldrich, США): в каждую лунку вносили ростовую среду с 10-% содержанием готового раствора для проведения МТТ теста, затем осуществляли инкубирование культурального планшета в течение 4 часов. По окончании требуемого времени полностью удаляли внесенный ранее раствор и лизировали клеточные мембраны добавлением 100 мкл раствора для экстракции формазана. Оптическую плотность регистрировали на вертикальном спектрофотометре (Multiskan GO Thermo Scientific, Япония) при длине волны 570 нм.

Статический анализ полученных результатов проводили в программе RStudio (Version 0.99.903 – © 2009-2016 RStudio, Inc.).

Результаты исследования и их обсуждение

Визуальная оценка накопления нерастворимого формазана в клеточной культуре ЛЭЧ 3-81, осуществляемая по интенсивности пурпурного окрашивания, а также оценка морфологии и конфлюэнтности культуры клеток, выполняемая посредством инвертированной темнопольной микроскопии позволяют судить о влиянии исследуемого препарата и его концентраций на культивируемые клетки.

Степень активности митохондриальных дегидрогеназ, определяемая посредством МТТ-теста и свидетельствующая об активности работы электрон-транспортной цепи в целом, обнаруживает закономерную прямую связь с используемыми в эксперименте концентрациями ротенона.

Являясь токсическим соединением, данное вещество обнаруживает свой цитотоксический эффект в концентрациях 5 мкМ и 2,5 мкМ соответственно, полностью подавляя жизнеспособность клеток.

Концентрация ротенона 1,25 мкМ обладает выраженным цитостатическим эффектом, подавляя жизнеспособность большинства клеток, и, таким образом, не может быть использована для долгосрочного моделирования дисфункции митохондрий в клеточной культуре.

Концентрации ротенона в 0,625 мкМ, 0,3125 мкМ и 0,156 мкМ обладают значительно менее выраженным цитостатическим эффектом. Так, по результатам МТТ-теста и микроскопии, можем говорить о достоверном ($p<0.001$) снижении ферментативной активности комплекса I и незначительном снижении жизнеспособности клеток, не сопровождающимся выраженным изменением морфологии в клеточной линии.

Рис. 1. Влияние различных концентраций ротенона на клеточную линию «ЛЭЧ 3-81»

Выводы

1. Различные концентрации изофлавоноида ротенона ингибируют НАД-Н дегидрогеназы в митохондриях клеточной культуры в разной степени, оптимальная пороговая концентрация, способная вызвать дисфункцию митохондрий при сохранной жизнедеятельности клеток - 0,625 мкМ.

2. Полученные сведения можно использовать в дальнейшем изучении митохондриальной дисфункции и нейродегенеративных заболеваний. Одно из возможных направлений реализации – разработка тест-системы для превентивной диагностики НДГЗ по оценке степени структурно-функциональных нарушений митохондрий.

Список литературы:

1. Иванова В.В. Функционирование дыхательной цепи митохондрий фибробластов линии Bj в условиях глюкозного голодания и воздействия различных доз ротенона / Иванова В.В., Старостина И.Г., Мартынова Е.В., Перейра С.П., Оливейра П.Дж., Ризванов А.А. // Гены и клетки. – 2015. – № 4. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/funktsionirovanie-dyhatelnoy-tsepi-mitohondriy-fibroblastov-linii-bj-v-usloviyah-glyukoznogo-golodaniya-i-vozdeystviya-razlichnyh-doz (дата обращения: 25.03.2021).

2. **Monzio Compagnoni G. et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease // Molecular neurobiology. – 2020. – Т. 57. – С. 2959-2980.**

3.Weidling I. W., Swerdlow R. H. Mitochondria in Alzheimer's disease and their potential role in Alzheimer's proteostasis // Experimental neurology. – 2020. – С. 113321.

4.Gao C. et al. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on sodium azide-induced oxidative stress in PC12 cells // International journal of molecular medicine. – 2018. – Т. 41. – №. 1. – С. 242-250.

УДК 577.24

Ярошенко А.А., Степанова В.А., Комарова Л.С., Сабирьянова К.А., Бачура В. Д., Десятова М.А., Шуман Е.А.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА (CRISPR/CAS-9)

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская Федерация

Yaroshenko A.A., Stepanova V.A., Komarova L.S., Sabiryanova K.A., Bachura V.D.,Desyatova M.A., Shuman E.A.

CLINICAL PERSPECTIVES OF HUMAN GENOME EDITING SYSTEM (CRISPR/CAS-9)

Department of medical biology and genetics
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: vicktoriakadulina@yandex.ru

Аннотация. В статье описывается применение системы CRISPR/Cas-9 и клинические перспективы ее применения в редактировании генома человека. А именно использование данной системы для редактирования генома у пациентов с ВИЧ- инфекцией и вирусом герпеса.

Annotation. The literature review examines the mechanism of action of genome editing through the CRISPR interaction system (from the English. clustered