

Таблица 1.

Типы клеток	Виды	Чапека (30–35 дней)		Сабуро (5 дней)		
		Биомасса	Натив.р	Биомасса	Натив.р	
Клетки <i>Chlorella sp.</i>	AM1	0*	1	0	1	Свежие культуры
	AM2	1	2	1	2	
Эритроциты	AM1	нет#	1	6	8	Заморозка (10 дней)
	AM2	нет	1	7	9	

0* – количество лунок в которых наблюдается агглютинация (склеивание) эритроцитов/клеток водорослей. нет# – реакция агглютинация не проводилась.

свидетельствует о токсичности для млекопитающих, в том числе людей. Полученные результаты можно увидеть в таблице 1 и на рисунке 1.

Температура заморозки –16 – –18 °С.

У AM2 активность лектинов выше, чем у AM1. Высокая гемолитическая активность свидетельствует о токсичности для человека. Это может стать помехой в использовании для биодеградации. Зато, открывает перспективы создания на основе штаммов лекарственных препаратов (антибактериальных, противогрибковых, противоопухолевых), сельскохозяйственных препаратов для борьбы с вредителями. Планируется исследование активности против бактериальных и грибковых культур.

Показано, что лектины из исследуемых культур выдерживают однократную заморозку на 10 дней. После второй заморозки их активность резко снижается. Вероятно, белковые

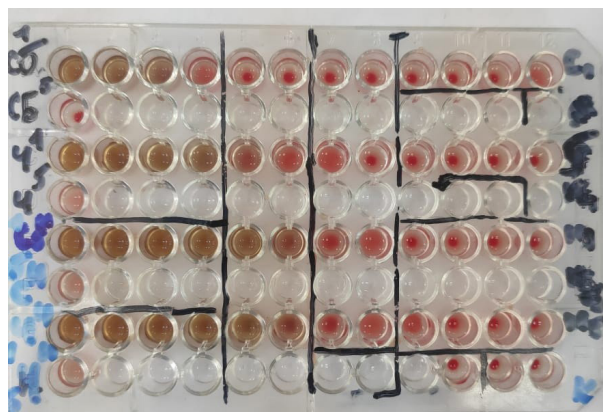


Рис. 1. Гемолиз эритроцитов кролика. Разрушение мембран эритроцитов лектинами приводит к окислению входящего в состав гема железа и изменению окраски с кроваво-красной до бурой

молекулы лектинов повреждаются кристаллами льда, но при слабых повреждениях их нативная структура сохраняется.

Список литературы

1. Mindubaev A. Z., Babynin E. V., Bedeva E. K., Minzanova S. T., Mironova L. G., Akosah Y. A. // *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, 2021. – Vol. 66. – № 8. – P. 1239–1244. – DOI: 10.1134/S0036023621080155.
2. Barre A., Bourne Y., Van Damme E. J. M., Rougé P. Overview of the Structure–Function Relationships of Mannose-Specific Lectins from Plants, Algae and Fungi // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019. – Vol. 20. – № 254. – P. 1–49. – DOI: 10.3390/ijms20020254.

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ МИКРОРНК НА ОСНОВЕ ТВЕРДЫХ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ IN VITRO

Е. М. Красникова, К. В. Невская
Научный руководитель – к.б.н., доцент А. Г. Першина

Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, проспект Ленина 30, emk15@tpu.ru

МикроРНК – двухцепочечные малые некодирующие молекулы РНК, длиной в среднем 22 нуклеотида, участвующие в регуляции экспрессии генов в клетках. В геноме человека содержится более 2000 микроРНК, ответственных

за нормальное функционирование организма. Они могут быть вовлечены в развитие патологических процессов в организме, приводящим к различным заболеваниям. В связи с этим микроРНК вызывает высокий интерес у научного

сообщества [1]. Также микроРНК участвуют в регуляции таких процессов как клеточная пролиферация, дифференцировка и апоптоз, нарушение которых приводит к инициации, прогрессированию и метастазированию злокачественных опухолей [2]. В связи с этим перспективным направлением является разработка препаратов на основе микроРНК для терапии онкологических заболеваний.

Целью работы являлось исследование доставки микроРНК в опухолевые клетки с использованием твердых липидных наночастиц (ТЛЧ) *in vitro*.

Экспериментальная часть

ТЛЧ готовили согласно протоколу, предложенному Reyes-González и коллегами [3], с модификациями. Использовали 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (DSPE-PEG2000), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин 18:1 (Δ^9 -Cis) PC (DOPC) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin и 3 β -Hydroxy-5-cholestene, 5-Cholesten-3 β -ol (Sigma Grade, $\geq 99\%$).

Для приготовления флуоресцентно-меченых ТЛЧ использовали микроРНК мимик Cy5-hsa-miR-148a-5p, содержащий флуоресцентно-меченный РНК-олигонуклеотид смысловой цепи 5'-Cy5-aaaguuucagacacucsgacu-3' и стандартный РНК-олигонуклеотид пассажирской цепи 5'-ucggagugucisagaacuuuu-3'.

Целостность микроРНК в составе ТЛЧ оценивали методом электрофореза в 12 % ПААГ. Для детектирования РНК окрашивали бромистым этидием и проводили анализ под УФ светом (G-Box, Syngen).

Эксперименты по оценке доставки ТЛЧ, содержащих микроРНК, выполняли на двух клеточных линиях рака молочной железы человека – T47D и BT474. Клетки инкубировали в течение 4 и 24 часов в полной питательной среде RPMI-1640 с внесением флуоресцентно-мечен-

ного микроРНК мимика Cy5-hsa-miR-148a-5p, упакованного в ТЛЧ. В качестве контроля проводили трансфекцию клеток Cy5-hsa-miR-148a-5p мимиком с помощью метафектена. Процент Cy5 позитивных клеток (динамику накопления ТЛЧ) определяли с использованием проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter). Для оценки жизнеспособности клеток проводили окрашивание 4', 6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Проникновение ТЛЧ в клетки также исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMi8 (Leica, Германия), для окрашивания ядер использовали Hoechst 33342, цитоплазмы клеток – CalceinAM (Thermo Fisher).

Результаты исследования

Электрофоретическая подвижность микроРНК мимика в составе ТЛЧ соответствовала подвижности свободного дуплекса и была чуть меньше, чем подвижность одноцепочечных РНК-олигонуклеотидов, входящих в его состав, что подтверждает сохранение целостности Cy5-hsa-miR-148a-5p в составе ТЛЧ.

По данным проточной цитометрии уже через 4 часа после внесения ТЛЧ с Cy5-hsa-miR-148a-5p микроРНК мимиком практически все клетки являлись Cy5⁺, то есть содержали ТЛЧ. Увеличение времени инкубации до 24 часов сопровождалось увеличением средней интенсивности флуоресценции (MFI), что указывает на увеличение числа ТЛЧ, проникнувших в клетки. При этом поглощение ТЛЧ не приводило к гибели клеток согласно данным проточной цитометрии с окрашиванием DAPI. Проникновение ТЛЧ в клетки было подтверждено с использованием флуоресцентной микроскопии, что свидетельствует об эффективном проникновении комплекса микроРНК с липосомами в опухолевые клетки рака молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29.09.2021 № 075-15-2021-1073).

Список литературы

1. Wang Z. *MicroRNA interference technology*. Berlin: Springer-Verlag, 2009. – 197 p.
2. Szczepanek J., Skorupa M., Tretyn A. // *Cells*, 2022. – V. 11. – № 6. – 1008.
3. Reyes-González J. M., Armaiz-Peña G. N., Mangala L. S., Valiyeva F., Ivan C., Pradeep S., Echevarría-Vargas I. M., Rivera-Reyes A., Sood A. K., Vivas-Mejía P. E. // *Mol Cancer Ther*, 2015. – V. 14. – P. 2260–2269.