

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Сергеева И. А., Букатич А. А., Наумова А. В. Проявление симптомов эмоционального выгорания у студентов в условиях дистанционного обучения // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. – 2020. – №. 12-1. – С. 96-100.
2. Досбергенова С. Ж. Влияние дистанционного обучения на здоровье и образ жизни студентов // Молодой учёный. – 2021. – №. 16. – С. 37-38.
3. Куликова Т. И. Психоэмоциональное состояние студентов во время перехода на дистанционное обучение в первую волну самоизоляции // Педагогический имидж. – 2021. – №. 1 (50). – С.112-121.
4. Барканова О. В. Методики диагностики эмоциональной сферы: психологический практикум [серия: Библиотека актуальной психологии]. – Красноярск: Литера-Принт, 2009. – 237 с.

Сведения об авторах

Е.А. Басова – студентка

М.А. Фролова – студентка

А.В. Семёнов – студент

Е.М. Гагарина – кандидат медицинских наук, доцент кафедры

Information about the authors

E.A. Basova – student

M.A. Frolova – student

A.V. Semenov – student

E.M. Gagarina - Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor of the Department

УДК: 577.24

ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ, ЛЕЖАЩИХ В ОСНОВЕ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Вячеслав Дмитриевич Боковой¹, Мария Анатольевна Десятова², Артем Владимирович Коротков³, Олег Германович Макеев⁴

¹⁻⁴ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

¹slava.bokovoy@gmail.com

Аннотация

Введение. Для комплексного изучения атопического дерматита необходима наглядная модель, способная воспроизводить морфологическую и клиническую картину заболевания, его различные стадии – такая модель позволяет воздействовать на каждое звено патогенеза в отдельности. В настоящее время подобной модели атопического дерматита не существует. **Цель исследования** – оценить применимость технологии нокдауна гена филагтрина в клеточной культуре мыши, с последующей обработкой аллергенами в качестве действующей модели атопического дерматита. **Материалы и методы.** Конструировали вектор, с подготовкой нуклеотидов, с последующей

рестрикцией и легированием. Высаживали компетентные клетки трансгенного штамма бактерии *Escherichia coli* на подготовленную среду. Вносили модифицированный генетический материал в организм мышей на основе плазмид *E. coli*. **Результаты и обсуждение.** В культуре клеток мыши, путем введения плазмид был задействован механизм CRISPR/Cas9, заблокировавший экспрессию гена филаггрина. При пересадке культуры в хвостовую часть грызуна и воздействию на него аллергена (пылевой клещ) – наблюдали экзематозные поражения, т. к. отсутствует протеолитическая обработка рогового слоя эпидермиса филаггрином, а в сыворотке крови обнаружили иммуноглобулины IgE и IgG – что свидетельствует об успехе метода. Модель на основе модификации генетического материала мышей – работает. **Выводы.** Создана модель атопического дерматита на основе блокировки экспрессии генов филаггрина. Дальнейшие исследования будут направлены на верификацию метода.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, атопический дерматит.

CREATING A MODEL OF ATOPIC DERMATITIS

Vyacheslav D. Bokovoy¹, Mariya A. Desyatova², Artem V. Korotkov³, Oleg G. Makeev⁴

¹⁻⁴Ural state medical university, Yekaterinburg, Russia

¹slava.bokovoy@gmail.com

Abstract

Introduction. For a comprehensive study of atopic dermatitis, a visual model is needed that can reproduce the morphological and clinical picture of the disease, its various stages – such a model allows you to influence each link of pathogenesis separately. Currently, there is no such model of atopic dermatitis. **The aim of the study** – to evaluate the applicability of the filaggrin gene knockdown technology in mouse cell culture, followed by allergen treatment as an effective model of atopic dermatitis. **Materials and methods.** A vector was constructed, with the preparation of nucleotides, followed by restriction and doping. Competent cells of a transgenic strain of *Escherichia coli* bacteria were planted on a prepared medium. Modified genetic material was introduced into the body of mice based on *E. coli* plasmids. **Results and discussion.** In mouse cell culture, the CRISPR/Cas9 mechanism was activated by the introduction of plasmids, which blocked the expression of the filaggrin gene. When transplanting a culture into the tail part of a rodent and exposing it to an allergen (dust mite), eczematous lesions were observed, because there is no proteolytic treatment of the stratum corneum of the epidermis with filaggrin, and immunoglobulins IgE and IgG were found in the blood serum, which indicates the success of the method. The model based on the modification of the genetic material of mice works. **Conclusions:** A model of atopic dermatitis based on blocking the expression of filaggrin genes has been created. Further research will be aimed at verifying the method.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, atopic dermatitis.

ВВЕДЕНИЕ

Атопический дерматит – это хроническое воспалительное кожное заболевание, способное к рецидивам. Изучение его патофизиологии, в основном, сконцентрировано на иммунных нарушениях и на снижении функции барьера эпидермиса [1]. Однако, для комплексного изучения необходима наглядная модель, способная воспроизводить морфологическую и клиническую картину заболевания, его различные стадии – такая модель позволяет воздействовать на каждое звено патогенеза в отдельности. В настоящее время подобной модели атопического дерматита не существует. Целью данной работы является ее создание на основе блокировки генома филагрина технологией CRISPR/CAS9. CRISPR - ряд палиндромных последовательностей ДНК прокариотических организмов, а Cas9 – эндонуклеаза, распознающая конкретные фрагменты молекулы ДНК при помощи последовательностей CRISPR [2]. На основе исследования был сделан вывод о применимости данного метода для создания модели заболевания и его дальнейшем использовании.

Цель исследования – оценить применимость технологии нокдауна гена филагрина в клеточной культуре мыши, с последующей обработкой аллергенами в качестве действующей модели атопического дерматита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Конструирование вектора

Вектор содержит бактериальный ORIGIN репликации, ген устойчивости к канамицину, промотор U6, два сайта рестрикции BsmBI и терминатор транскрипции BsmBI, узнающий асимметричный сайт (CGTCTC) и пригодный для внесения двуцепочечного разрыва. В результате гидролиза вектора Cloning_Vector_BsmB, I из него удаляются сайты узнавания фермента BsmBI и образуются липкие концы для лигирования фрагмента ДНК, кодирующего специфическую последовательность gRNA. Преимуществом обработки ферментом BsmBI и последующего лигирования является возможность применить оба подхода в протоколе клонирования вектора для экспрессии gRNA [5].

2. Материалы

- Вода. Здесь и далее в протоколах использовали деионизованную воду (ddH₂O) с удельным сопротивлением более 18 Мом/см.
- Плазмидный вектор gRNA_Cloning_Vector_BsmBI (Addgene #41824.)
- Олигонуклеотиды. Для выбранной последовательности gРНК вида G(N)19 NGG и комплементарной ей последовательности CCX(X)19 у сторонней организации: (Сибэнзим, Россия)

- Полинуклеотидкиназа фага T4 (T4 PNK, NEB M0201S) и соответствующий буфер (10X T4 PNK Buffer, заказывали там же, как и лигазу фага T4 (T4 DNA ligase, NEB M0202S) и соответствующий буфер (T4 DNA Ligase Buffer).
- Фермент BsmBI (Sigma-Aldrich).
- Бычий сывороточный альбумин (BSA), концентрация 20 мг/мл, (Sigma-Aldrich).
- Компетентные клетки Escherichia coli (NEB C3019, Sigma-Aldrich).
- Канамицин (Kanamycin sulfate K1377-1G, Sigma-Aldrich).
- Среда LB (LB Broth (Luria low salt Sigma-Aldrich L3397).
- Агаризованная среда LB (LB Broth with agar Sigma-Aldrich L2897-250G)
- Наборы для выделения плазмидной ДНК (GenElute™ Soil DNA Isolation Kit DNB100-50RXN DNB100 (Sigma-Aldrich).

3. Подготовка нуклеотидов

В пробирке смешивали 1 мкл каждого из двух олигонуклеотидов gRNA_F и R gRNA, после чего к раствору добавляли мкл T4 DNA Ligase Buffer и 0.5 мкл T4 PNK. Полученный раствор перемешивали пипетированием и инкубировали при 37°C в течение 30 минут, а затем при 95°C в течение 5 минут. В последующем температуру понижали до 25°C по 5°C в минуту.

4. Реакция рестрикции – лигирования.

В пробирку вносили 6.5 мкл ddH₂O, 1 мкл T4 DNA Ligase Buffer и 0.1 мкл BSA, затем добавляли 1 мкл плазмиды gRNA_Cloning_Vector_BsmBI, 6. 0.5 мкл T4 DNA Ligase и 0.5 мкл BsmBI. Полученную смесь перемешивали пипетированием и инкубировали при 37°C в течение 5 мин, а затем при 20°C в течение 5 мин. Последний шаг повторяли 30 раз.

5. Трансформация E. Coli

Компетентные клетки E. Coli. Высаживали в чашки Петри на (25 мм) на твердую агаризованную среду LB (25 мл) и вносили 1 мкл смеси, полученной на предварительных этапах. Дополнительно в среду вносили антибиотик канамицин в концентрации 50 мкг/мл. Чашки помещали в термостат на 24 часа.

6. Выделение плазмид

Отпечаток клеток, имеющих рост на агаре, помещали в жидкую культуру. Культуру клеток наносили на агаризованную среду LB (LB Broth with agar Sigma-Aldrich L2897-250G) методом росчерка и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Культуры, проявившие наибольший рост петлей, переносили в стерильные 50 мл пробирки и с жидкой культурой в среде LB (LB Broth (Luria

low salt Sigma-Aldrich L3397). Спустя 48 часов после инкубирования при 38°C среду с клетками центрифугировали при 3000 – 5000g. Сливали супернатант. При необходимости повторяли процедуру так, чтобы бактериальный осадок был собран в одной пробирке. В дальнейшем полученные бактерии с целью получения плазмид обрабатывали в соответствии с протоколом производителя GenElute™ Soil DNA Isolation Kit DNB100-50RXN DNB100 Sigma-Aldrich. Плазмиды хранили и наращивали в составе трансгенного штамма бактерии E.coli. Для выделения и очистки плазмидного генетического материала бактерии размораживали и наращивали на жидкой LB-среде с добавлением используемого для селекции антибиотика ампициллина (75 мкг/мл) [6]. После получения высокой плотности бактерий культуры центрифугировали при 1000g в течение 10 минут, супернатант удаляли, а осадок использовали для выделения плазмидной ДНК с помощью коммерческого набора реагентов MiniprepKit (Zymo Research, США) в соответствии с протоколом производителя.

Количественный подсчет пДНК проводили на спектрофотометре (BIO-RAD) при длине волны 260 нм. Качественный анализ проводили по соотношению OD 260 /OD 280.

Образцы считали пригодными при $OD\ 260 /OD\ 280 = 1.8 \pm 0.1$. Копийность полученных растворов пДНК определяли по формуле: (количество ДНК (нг) $\times 6,022 \times 10^{23}$) / (длина плазмиды (п.о.) $\times 1 \times 10^9 \times 650$).

Плазмиды доставляли в клетки по методу липосомальной трансфекции с использованием комплекса поликатионных липидов Escort III (Sigma Aldrich, США). Для приготовления трансфекционной смеси 10 мкл Escort III разводили до 500 мкл DMEM/F- 12; 20 нг плазмидной ДНК переносили в 500 мкл DMEM/F-12 (в обоих случаях использованная среда не содержала фетальной бычьей сыворотки). Пробирки смешивали, пипетировали и инкубировали при комнатной температуре 45 минут. Трансфекционная смесь для контрольной группы не включала пДНК с геном FLA.

В лунки 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл приготовленных ДНК-липидных комплексов. Культуры возвращали в инкубатор на 12-18 часов, а затем в лунках меняли питательную среду на свежую ростовую с 10% ФБС.

Параметры направляющей РНК для мыши.

1 AAGTTCAAGTGCCCGTTCGAG
2 CGACGACGATGACTCCTCCT
3 CTCACGCCTACGGTTTGGTT
4 TTTAAGCCTGACCACCGAAT
5 SACCTACCAGCTTGACGTCG

6 TCTTACCCACGACGTCAAGC

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из факторов патогенеза атопического дерматита является нарушение функций эпидермального барьера, а фактор, обеспечивающий целостность кожного барьера – белок филаггрин. Он расположен в хромосоме 1, локус q21.3. Нарушение его функций приводит к дефектам барьера, который служит местом колонизации бактериальными антигенами и сенсибилизации к аллергенам. Соответственно мутация гена взаимосвязана с развитием атопического дерматита [3]. Возможно, филаггрин играет определенную роль не только в формировании барьерной функции, но и в иммунном ответе. Эта теория подтверждена многочисленными исследованиями [4]. В культуре клеток мыши, путем введения плазмид был задействован механизм CRISPR/Cas9, заблокировавший экспрессию гена филаггрина. При пересадке культуры в хвостовую часть грызуна и воздействии на него аллергена (пылевой клещ) – наблюдали экзематозные поражения, т. к. отсутствует протеолитическая обработка рогового слоя эпидермиса филаггрином, а в сыворотке крови обнаружили иммуноглобулины IgE и IgG – что свидетельствует об успехе метода. Модель на основе модификации генетического материала мышей работает.

ВЫВОДЫ

1. Создана модель атопического дерматита на основе блокировки экспрессии генов филаггрина.
2. Дальнейшие исследования будут направлены на верификацию метода, и в случае успешности – использование модели для разработки патогенетической терапии заболевания.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Expression of vascular endothelial growth factor and other cytokines in atopic dermatitis, and correlation with clinical features / Samochocki Z., Bogaczewicz J., Sysa-Jezdrzejowska A. et al. // *International Journal of Dermatology*. – 2015; 55(3): 141–146.
2. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA / Garneau J. E. et al. // *Nature*. – 2010; 468 (7320): 67-71.
3. Анализ заболеваемости заболеваниями кожи и подкожной клетчатки в Российской Федерации / Кубанова А. А., Кубанов А. А., Мелехина Л. Е. и др. // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2017. – Т. 93, № 6. – С. 22-33.
4. Mice with epidermal filaggrin deficiency show increased immune reactivity to nickel / Petersen T.H., Jee M.H., Gadsbøll A.Ø. et al. // *Contact dermatitis*. – 2019; 80(3): 139-148.
5. Bogdanenko E.V., Zhdanov R.I. The natural and synthetic polymers of the non-lipid origin in gene delivery. *Genes & Cells*. – 2016; 11(3): 56-62.

6. Колоскова Е. М., Езерский В. А. Выделение и очистка плазмидной ДНК из трансформированных штаммов *E. Coli* DH 5A и TG1 // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2019. – № 4 – С. 105-112.

7. Oyoshi M. K., Murphy G. F., Geha R. S. Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen // Journal of allergy and clinical immunology. – 2009; 124(3): 485-493.

Сведения об авторах

В.Д. Боковой – студент

М.А. Десятова – младший научный сотрудник

А.В. Коротков – кандидат медицинских наук, доцент

О.Г. Макеев – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярных и клеточных технологий и радиоизотопной лаборатории ЦНИЛ, УГМУ

Information about the authors.

V.D. Bokovoy – student

M.A. Desyatova – junior researcher

A.V. Korotkov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor of the Department

O.G. Makeev – Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Chief Researcher of the Department of Molecular and Cellular Technologies and Radioisotope Laboratory of CSRL, Ural State Medical University

УДК: 612.591.06:577.152.344

ОБ УЧАСТИИ α_1 -АНТИТРИПСИНА КРОВИ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ, МЕХАНИЗМАХ ПОДДЕРЖАНИЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА И ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА ПРИ ПЕРЕГРЕВАНИИ

Арвид Франтишкович Висмонт¹, Светлана Анатольевна Жадан², Любовь Григорьевна Шуст³, Нил Владимирович Ткаченко⁴, Федор Дмитриевич Яковлев⁵, Татьяна Вячеславовна Абакумова⁶, Франтишек Иванович Висмонт⁷

¹⁻⁷УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

¹patfiz@bsmu.by

Аннотация

Введение. Известно, что печень играет важную роль в образовании и деградации физиологически активных веществ белковой и пептидной природы, участвующих в жизнедеятельности организма в норме и при патологии. Однако, участие ингибиторов протеиназ, синтезируемых печенью, в механизмах терморегуляции при перегревании до сих пор не изучено. **Цель исследования** – выяснить значение активности α_1 -антитрипсина крови в процессах детоксикации, регуляции уровня трийодтиронина в крови и температуры тела при перегревании. **Материалы и методы.** Опыты