Исследование тионинов семян чёрного тмина (*Nigella sativa*), обладающих цитотоксической, регуляторной и антифунгальной активностью

А. Б. КУЛЬКО[1], О. В. КИСИЛЬ[2], В. С. САДЫКОВА[2], В. Ф. МИХАЙЛОВ[3], И. М. ВАСИЛЬЕВА[4], Л. В. ШУЛЕНИНА[3], Г. Д. ЗАСУХИНА[4], Е. А. РОГОЖИН[2, 5]

[1] Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения, *Москва*
[2] НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, *Москва*
[3] Государственный научный центр Российской Федерации Институт биофизики ФМБА, *Москва*
[4] Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, *Москва*
[5] Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, *Москва*

Investigation of Thionins from Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seeds Showing Cytotoxic, Regulatory and Antifungal Activity

A. B. KUL'KO[1], O. V. KISIL[2], V. S. SADYKOVA[2], V. F. MIKHAILOV[3], I. M. VASILIEVA[4], L. V. SHULENINA[3], G. D. ZASUKHINA[4], E. A. ROGOZHIN[2,5]

[1] Municipal Scientific and Practical Center for Tuberculosis Control, *Moscow*
[2] Gause Research Institute of New Antibiotics, *Moscow*
[3] Federal Medical Biophysical Center, *Moscow*
[4] N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, *Moscow*
[5] M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, *Moscow*

Тионины (NsW1 и NsW2), ранее выделенные из семян эндемичного среднеазиатского растения — чёрного тмина, или чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), и обладающие выраженным ингибирующим действием по отношению к ряду бактериальных и дрожжевых патогенов, были исследованы на цитотоксические свойства против линий опухолевых клеток (AsPC-1, Colo357, RD и Jukart) в тестах *in vitro* в нано- и микромолярном диапазоне действующих концентраций, а также в качестве модуляторов экспрессии генов, контролирующих превращение нормальных клеток в злокачественные. Было обнаружено подавление экспрессии генов семейства *MMP, RhoA, miR21* в клетках рабдомиосаркомы человека (RD), тогда как влияние молекул на эти гены в клетках крови не было обнаружено. Показано, что тионины чёрного тмина в клетках RD и Jukart индуцируют почти 90% гибели клеток. Кроме того, показано ингибирующее действие данных полипептидов на клинические изоляты грибов *Aspergillus ochraceus* и *A.fumigatus* на уровне, сопоставимом с активностью препарата амфотерицина В. Эти данные указывают на то, что исследованные полипептиды можно расценивать как перспективные противоопухолевые и антимикотические природные агенты.

Ключевые слова: тионины, чёрный тмин, Nigella sativa, цитотоксичность, противоопухолевая активность, экспрессия генов, антимикотики, Aspergillus spp.

Thionins (NsW1 and NsW2), earlier isolated from the seeds of endemic Middle-Asian black cumin (*Nigella sativa* L.), showing significant inhibitory action on some bacterial and yeast pathogens were investigated for cytotoxic properties against several tumor cell lines (AsPC-1, Colo357, RD and Jukart) *in vitro* within nano- and micromolar ranges of the active concentrations and as modulators of expression of the genes controlling conversion of normal cells to malignant ones. Suppression of the expression of the genes from *MMP, RhoA, miR21* families in human rhabdomyosarcoma (RD) cells was observed, whereas the influence of the molecules on the genes in normal blood cells was not identified. It was shown that the thionins from black cumin induced almost 90% of the cell death in RD and Jukart lines. Moreover, the polypeptides inhibited clinical isolates of *Aspergillus ochraceus* and *A.fumigatus* at the level comparable with that of amphotericin B. The data demonstrated that the peptides could be considered as perspective antitumor and antimycotic agents.

Key words: thionins, black cumin, Nigella sativa, cytotoxity, antitumor activity, gene expression, antimycotics, Aspergillus spp.

Введение

Растительные тионины представляют собой семейство цистеин-богатых пептидов с молекулярной массой около 5 кДа, обнаруженных у различных одно- и двудольных растений. В настоящее время известно более 100 последовательностей тионинов, выделенных из 15 видов растений [1]. По числу остатков цистеина в молекуле тионины делятся на две группы: пептиды, содержащие 6 и 8 остатков цистеина, соответственно [2]. Показано, что тионины локализованы в клеточ-

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11, стр.1. НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе

ных вакуолях [3]. Тионины синтезируются в виде препробелков с молекулярной массой около 18 кД, которые включают в себя сигнальный пептид и С-концевой пропептид [4]. Известно, что тионины ингибируют рост бактерий и грибов *in vitro* [5], также синтез данных молекул резко увеличивается в ответ на проникновение в растение патогенных микроорганизмов [6—8]. Кроме того, они действуют на культуры клеток млекопитающих и насекомых, и растительные протопласты [1, 9, 10]. Ранее были изучены свойства экстрактов 13 африканских растений [11], женьшеня, лимонника [12], солодки [13] и др. Антимутагенной и антиканцерогенной активностью обладал также экстракт чеснока (*Allium sativum*), который эффективно снижал повреждающее действие мутагенов на клетки человека, стимулируя процессы репарации [14]. Кроме того, растительные экстракты в ряде случаев повышают эффективность традиционных противоопухолевых средств, ограничивая степень их побочного эффекта.

К таким перспективным противоопухолевым растительным экстрактам может быть отнесена чернушка посевная (*Nigella sativa*), обладающая способностью ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз в различных спонтанных или индуцированных канцерогенами опухолевых клетках животных [15]. При этом авторами были получены результаты, свидетельствующие о снижении экспрессии онкогенов (*cMyc, Brca1, Brca2* и др.) и повышении экспрессии генов-супрессоров (*p53* и *p21*), что может свидетельствовать о содержании в экстракте растения действующего вещества или их комплекса, обладающее свойствами, влияющих на экспрессию генов, контролирующих те или иные процессы в клетке. Ранее из семян чёрного тмина был выделен и охарактеризован комплекс полипептидов, обладающих антимикробными (в том числе антифунгальными) свойствами в биотестах *in vitro* по отношению к ряду фитопатогенных микроорганизмов [16, 17], а также условно-патогенным бактериям и дрожжеподобным грибам [18].

Цель настоящей работы заключалась в изучении цитотоксических, регуляторных и антифунгальных свойств антимикробных пептидов, принадлежащих к семейству тионинов, в том числе явления модификации экспрессии генов, контролирующих процессы онкогенеза, в клетках человека.

Материал и методы

Биологический материал. Семена. В работе были использованы семена чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), собранные на территории Республики Узбекистан в 2008 г. Семена хранились в тёмном сухом проветриваемом помещении при температуре 15°С.

Микроорганизмы. Протестированные на чувствительность к тионинам клинические штаммы грибов р. *Aspergillus* были выделены при диагностике пневмомикозов у больных туберкулёзом, в микологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом ДЗМ»: *A.flavus* 905м (содержимое лёгочной полости), *A.fumigatus* 163м (содержимое лёгочной полости), *A.niger* (мокрота), *A.ochraceus* 497м (жидкость БАЛ) и *A.terreus* 1133м (мокрота). Все эти штаммы проявляли устойчивость *in vitro* к препарату флуконазол (с помощью системы «Sensititre», TREK Diagnostics Systems были установлены максимально высокие значения МПК флуконазола: >256 мкг/мл), что подтверждает наличие природной устойчивости у грибов рода *Aspergillus* к флуконазолу [19—22].

Линии опухолевых клеток AsPC-1 (рак поджелудочной железы), Colo357 (панкреатическая карцинома) (лаборатория клеточных взаимодействий ИБХ РАН); RD (рабдомиосаркома человека) и Jukart (Т-клеточная форма острого лимфобластоидного лейкоза) (лаборатория молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов ФМБЦ ФМБА).

Выделение тионинов из семян чёрного тмина проводили в строгом соответствии методике, описанной в работе [18]. Выделение тионина из зерновок пшеницы (*Triticum kiharae*) осуществляли, как описано в [23].

Определение концентрации тионинов проводили спектрофотометрическим методом. Для этого высушенный пептид растворяли в 1 мл деионизированной воды. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре U-3210 («Hitachi», Япония). В качестве контроля использовали деионизированную воду. Концентрацию белков и пептидов определяли по спектру с использованием следующей формулы: $C=1{,}55A_{280}-0{,}76A_{260}$, где A_{280} — оптическая плотность раствора при 280 нм, A_{260} — оптическая плотность раствора при 260 нм.

Методы определения функциональной активности. Культивирование опухолевых клеток AsPC-1, Colo357, RD и Jukart. Клетки культивировали в пластиковой посуде в среде ДМЕМ (модифицированная среда Дульбекко) с добавлением 3% телячьей эмбриональной сыворотки. Монослой достигался на 3 сутки. Конечная концентрация клеток составляла примерно 1 млн/мл.

Культивирование клеток крови. Кровь брали из вены и помещали в гепаринизированные пробирки. Перед посадкой кровь суспендировали, добавляли готовую среду RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), содержащую 10% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, глютамин (30 мг/100 мл среды), пенициллин (1000 ед./100 мл среды), ФГА (1 мл разведённого в 5 мл флакона/100 мл среды). Полученный раствор разливали по 3 мл в стерильные флаконы и инкубировали при 37°С в течение суток. Инкубирование линий опухолевых клеток с веществами. Тестируемые соединения вносили через 20—24 ч после посадки клеток. Инкубацию клеток проводили в течение 20—24 ч до обработки.

Определение уровня экспрессии генов. Уровень экспрессии генов оценивали по содержанию в клетках их мкРНК. Тотальную РНК выделяли тризольным методом с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для синтеза кДНК использовали набор реактивов для обратной транскрипции «GenePak PCR Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия), содержащий обратную транскриптазу M-MLV («ThermoScientific», США) и случайные гексануклеотидные праймеры, согласно протоколу фирмы-производителя. Тотальную РНК использовали в реакции обратной транскрипции с добавлением специфического «stem-loop»-праймера к зрелой miR34a (ООО «ДНК-Синтез», Россия) и mir21 (НПФ «Литех», Россия) в отдельных пробирках. В смесь, содержащую 1×ОТ буфер (P/N: 4319981, «Applied Biosystems», США), 0,25 мМ dNTPs, 3.33 ед/мкл обратной транскриптазы M-MLV («ThermoScientific», США) и 0,25 ед/мкл ингибитора РНК-азы («Applied Biosystems», США), вносили 3 мкл (50 нМ) «stem-loop» праймера и 5 мкл суммарной РНК. «Stem-loop»-праймеры (*miR34a*: 5/ GTCG-

TATCCAGTGCTGGGTCCGAGTGATTCGCACTGGATACGACACAACCA-3/ и miR21: 5/- CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG TCA ACA TC-3/) были использованы для синтеза первой цепи кДНК при следующих температурных условиях: 16°С/ 30 мин, 42°С/30 мин и 85°С/5 мин. В контрольные пробы для обратной транскрипции вместо РНК была добавлена вода.

Количественное определение экспрессии генов проводили методом двухстадийной ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan, или в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I. Амплификацию исследуемых генов проводили на приборе «Cycler iQ5 Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad Laboratories», США) в объёме 25 мкл, содержащем готовую реакционную смесь для ПЦР («ThermoScientific», США), кДНК, а также специфические праймеры (НПФ «Литех», Россия) и зонды (ООО «ДНК-Синтез», Россия). Последовательности и концентрация праймеров и зондов, а также условия проведения ПЦР представлены в табл. 1.

Данные анализировали с использованием метода порогового значения цикла сравнения (C_t) с нормализацией по экспрессии гена b-actin в каждом образце. Для проверки специфичности ПЦР генов при использовании интеркалирующего красителя SYBR Green I продукты амплификации анализировали по кривым плавления («melt curve analysis») в следующих условиях: в диапазоне от 55°С/5 мин до 95°С/1 мин с шагом 1°С/15 с. При обработке результатов ПЦР в реальном времени вычисляли значение $2-\triangle\triangle C_t$, которое показывает, во сколько раз изменяется экспрессия исследуемого гена по сравнению с контролем. $\triangle\triangle C_t$ рассчитывали как: $\triangle\triangle C_t = \triangle C_t$(опыт) $- \triangle C_t$(контроль), и каждое значение $\triangle C_t = C_t$(исследуемый ген) $- C_t$(b-actin), где C_t — число циклов, необходимое для достижения порогового уровня флуоресценции, превышающего 10 стандартных отклонений от уровня фоновой флуктуации флуоресценции цикла ПЦР.

Определение антибиотической активности. Антибиотическое действие в отношении клинических изолятов микромицетов р. *Aspergillus* оценивали с помощью стерильных бумажных дисков (Бумага фильтровальная Ф ГОСТ 12026-76), на которые наносили тионин NsW2 семян тинина в концентрации 40 мкг/диск. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином В («НИИ Пастера», 40 мкг/диск) и флуконазолом («НИИ Пастера», 10 мкг/диск). Постановку и оценку результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием пакета статистических программ STATISTICA 6.0, который включал в себя определение меди-

Таблица 1. **Последовательности праймеров и зондов к исследуемым генам и условия проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР–РВ)**

Ген	Метод ПЦР-РВ	Последовательность праймеров и зондов 5'->3'	Концентрация праймеров и зондов	Условия ПЦР-РВ
hMMP-2	SYBR Green I	Прямой: ACATCAAGGGCATTCAGGAG Обратный: CTGAGCGATGCCATCAAATA	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 50 циклов: 95°С/15 с, 55°С/35 с и 72°С/40 с
hMMP-7	TaqMan	Прямой: CCATTTAGCAATTATGTCACCCTTTT Обратный: AATAAGACACAGTCACACCATAAAGGA Зонд: FAM-TTGCAGTTGGTTTTTGAATGTCTT TCACTCC-BHQ1	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 40 циклов: 95°С/13 с, 60°С/45 с
hMMP-9	SYBR Green I	Прямой: TCTTCCCTGGAGACCTGAGA Обратный: ATTTCGACTCTCCACGCATC	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 50 циклов: 95°С/15 с, 58°С/35 с и 72°С/40 с
hMMP-13	TaqMan	Прямой: CCCTTCTTCACACAGACACTAACG Обратный: TAAACAGAATCAAAGGCCACATC Зонд: FAM-ACCACTGCTCTTTTGTCTCCTGTC TTT AAT G-BHQ1	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 40 циклов: 95°С/13 с, 60°С/45 с
hTIMP-1	SYBR Green I	Прямой: AGACCTACACTGTTGGCTGTGAG Обратный: GACTGGAAGCCCTTTTCAGAG	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 40 циклов: 95°С/15 с, 53°С/35 с и 72°С/40 с
hTIMP-2	SYBR Green I	Прямой: ATGCACATCACCCTCTGTGA Обратный: CTCTGTGACCCAGTCCATCC	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 40 циклов: 95°С/15 с, 53°С/35 с и 72°С/40 с
hRhoA	SYBR Green I	Прямой: CGCTTTTGGGTACATGGAGT Обратный: CAAGCAAGGGCACCCAGATT	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 40 циклов: 95°С/15 с, 60°С/60 с
b-actin	SYBR Green I	Прямой: CGGGAAATCGTGCGTGAC Обратный: TGGAAGGTGGACAGCGAGG	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 40 циклов: 95°С/15 с, 60°С/35 с и 72°С/40 с
hIAP-1	SYBR Green I	Прямой: CTACAATGGAGTGCTCATCTG Обратный: CAGCCAGAGGCGATATTCATC	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/2 мин, далее 40 циклов: 95°С/15 с, 60°С/30 с и 70°С/30 с
hNFκBp65	SYBR Green I	Прямой: GTTCACAGACCTGGCATCC Обратный: TGTCACTAGGCGAGTTATAGC	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 40 циклов: 95°С/15 с, 60°С/35 с и 72°С/40 с
miR34a	TaqMan	Прямой: GCGATTGGCAGTGTCTTAGC Обратный: CAGTGCTGGGTCCGAGTGA Зонд: FAM-TCGTATCCAGTGCGAATCACTC-BHQ1	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 45 циклов: 94°С/15 с, 60°С/1 мин
miR21	SYBR Green I	Прямой: ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAG ACTGA Обратный: GTGTCGTGGAGTCGGCAATTC	500 нМ	Предварительная денатурация: 95°С/5 мин, далее 40 циклов: 95°С/15 с, 60°С/45 с

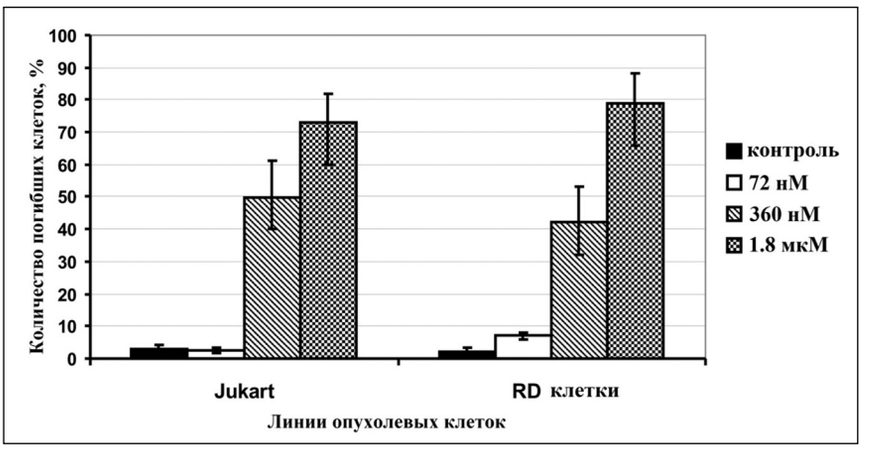

Рис. 1. **Уровни выживаемости опухолевых клеток Jukart и RD, обработанных тионином NsW2.**

аны и интерквартильного размаха. Для оценки значимости различий в группах применялись непараметрические критерии Манна–Уитни и парный критерий Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p<0,05$, где p — показатель вероятности ошибки (т.е. достоверности) полученных данных.

Результаты исследований

Выделение тионинов NsW1 и NsW2 из предварительно измельченных и обезжиренных семян чёрного тмина проводили кислотной экстракцией с последующим высаживанием ацетоном. Дальнейшая очистка осуществлялась комбинацией различных методов жидкостной хроматографии (аффинной, эксклюзионной и обращённо-фазовой высокоэффективной) [18]. Для анализа биологического действия был выбран пептид NsW2, содержание которого в семенах было преобладающим.

Цитотоксическая активность тионинов чёрного тмина (*N.sativa*). На основе ранее полученных результатов по антимикробной активности тионинов NsW1 и NsW2, изучаемые молекулы были проверены на наличие цитотоксических свойств. В качестве объектов были использованы линии 4 опухолевых клеток (см. раздел «Материалы и методы»). В первую очередь были отобраны две (RD и Jukart) из четырёх линий, на которых было проверено действие одного из двух гомологичных тионинов (NsW2) в трёх концентрациях методом пятикратного разведения (72, 360 нМ и 1.8 мкМ) с целью выявления у данных соединений наличия/отсутствия целевых свойств. Результаты приведены на рис. 1. Установлено, что на обе выбранные линии раковых клеток изучаемый полипептид проявил ожидаемый эффект, при этом принципиальных различий между ними выявлено не было. Так, при минимальной действующей концентрации (72 нМ) цитотоксическое действие молекулы было примерно на уровне контрольного варианта или немного превышало его (3—8% от общего числа клеток). Однако уже в случае пятикратного увеличения финальной концентрации тионина NsW2 (до 360 нМ), цитотоксичность резко увеличилась и составила 50% (для линии Jukart) и 42% (для линии RD), соответственно. При последующем пятикратном возрастании конечной концентрации (1,8 мкМ) пептида чёрного тмина эффект на обеих линиях усилился (в среднем 72—79% погибших клеток) (рис. 1). Таким образом, в предварительной серии экспериментов на примере одного из гомологов было показано наличие у данных соединений выраженных противоопухолевых свойств по типу цитотоксичности *in vitro,* причём регистрируемое действие имело характерную зависимость «доза/эффект».

Однако для уточнения полученных результатов, а также определения степени специфичности цитотоксического действия обоих тионинов в сравнительном аспекте, экспериментального определения значений $ИК_{50}$, была проведена серия аналогичных экспериментов, но с использованием двух других линий опухолевых клеток (AsPC-1 и Colo357), а также более широкого диапазона действующих концентраций (от 94 нМ до 3 мкМ) путём двукратных серийных разведений (рис. 2). В итоге по обеим выбранным клеточным линиям оба пептида продемонстрировали чётко выраженный линейный эффект возрастания уровня биологической активности при увеличении действующей концентрации. Интересно, что в случае линии AsPC-1 существенной разницы между обоими сравниваемыми гомологичными тионинами обнаружено не было ($ИК_{50}$ для NsW1/2 составила 375 нМ), в то время как по линии Colo357 — эффект действия NsW1 был выражен сильнее ($ИК_{50}$ для NsW1 также составила 375 нМ, а для NsW2 — 750 нМ). Характерно, что эффект полного ингибирования (ИК100) был достигнут на обоих клеточных линиям, но для AsPC-1 он визуализировался при аппликации 1,5 мкМ каждого тионина, а для Colo357 — только при максимальной тестируемой концентрации (3 мкМ). Полученные данные наглядно демонстрируют разный уровень специфичности тионинов семян чёрного тмина по отношению к опухолевым клеткам, имеющих различную онкологическую природу.

Регуляция экспрессии онкогенов при действии тионинов чёрного тмина (*N.sativa*). Для изучения возможной роли тионинов чёрного тмина (на примере NsW2) на регуляцию (модуляцию) экспрессии были использованы ключевые гены, принимающие активное участие в трансформации нормальной клетки в злокачественную, в её ста-

новление, способность к метастазированию. Для достижения этой цели сравнивали изменение экспрессии генов в клетках линии RD и крови человека. В табл. 2 показаны данные по уровням экспрессии в клетках RD и цельной крови.

В табл. 2 представлены данные по изменению уровня экспрессии генов по сравнению с контрольной группой (значение медианы экспрессии генов у контрольной группы было принято за 1).

В первую очередь можно заключить, что исследуемый полипептид различным образом воздействует на количественный уровень экспрессии целевых генов в клетках RD и цельной крови. В клетках RD количественный уровень экспрессии большого числа онкогенов (5 из 10 отобранных для анализа) был достоверно снижен (*MMP-7, MMP-13, RhoA, Mir21, IAP-1*), при этом для двух из них — *RhoA* и *IAP-1* — более чем в несколько десятков раз по сравнению с референсными значениями для гена β-актина (табл. 2). Интересно, что уровень экспрессии гена *RhoA* в нормальных клетках, в отличие от RD, активируется (в 1,85 раз), что может приводить к повышенному уровню биосинтеза и накоплению соответствующего продукта — белка Ras-зависимых гуанозинтрифосфатаз [24], тем самым повышая способность нормальных клеток к трансформации в злокачественные, в том числе с последующим метастазированием опухолей [25]. По всем остальным генам уровень экспрессии в нормальных клетках относительно референсного гена не отличался.

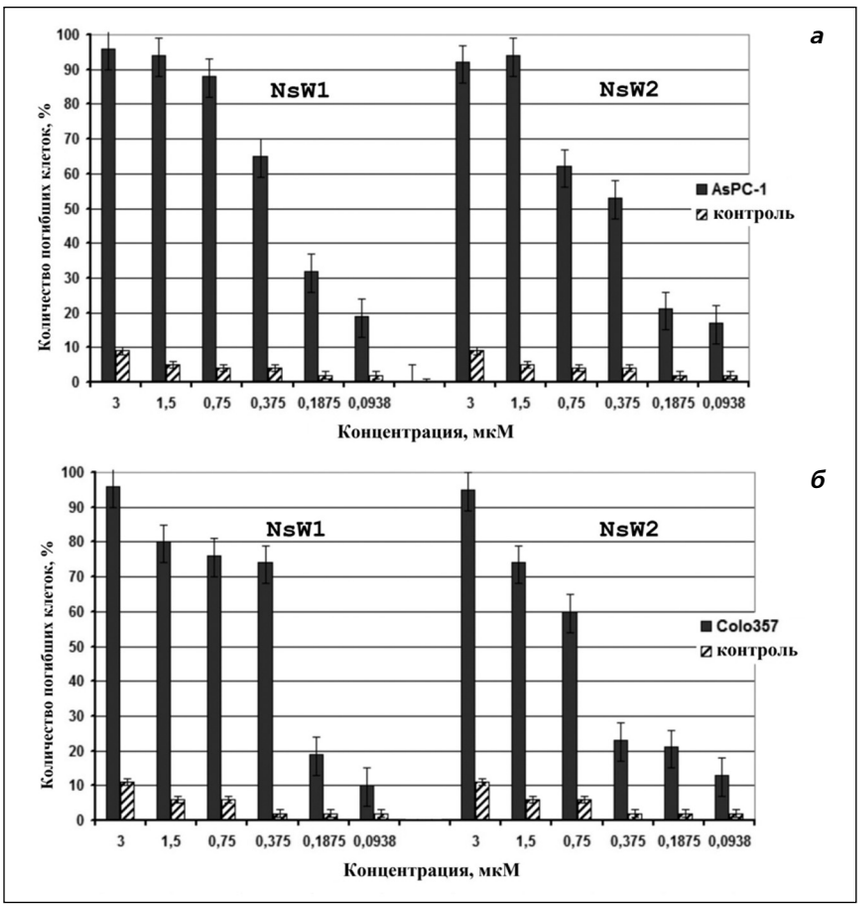

Рис. 2. **Уровни выживаемости опухолевых клеток после инкубирования с различными концентрациями тионина NsW2: *а* — клетки AsPC-1; *б* — клетки Colo357.**

Таблица 2. **Влияние тионина NsW2 на экспрессию генов в клетках крови и RD**

№	Гены	RD	Кровь
1	*MMP-7*	5,31↓	—
2	*MMP-9*	не регистрировалась	—
3	*MMP-13*	8,72↓	—
4	*TIMP-1*	не регистрировалась	—
5	*TIMP-2*	не регистрировалась	—
6	*RhoA*	45,45↓	1,85↑
7	*Mir21*	2,22↓	—
8	*Mir34*	—	—
9	*IAP-1*	в десятки раз↓	—
10	*NF-kB*	—	—

Примечание. «↓» — уменьшение содержание мРНК генов; «↑» — увеличения содержание мРНК генов; «—» — не оказывает статистически значимого различия с контролем.

Антифунгальная активность тионинов чёрного тмина (*N.sativa*) на клинических изолятах *Aspergillus* spp. Для определения уровня антимикробной активности тионина NsW2 методом диффузии в агар были использованы клинические изоляты пяти различных видов рода *Aspergillus* (*A.tereus, A.flavus, A.ochraceus, A.fumigatus, A.niger*). Для идентификации наличия эффекта ингибирования зоны роста колоний по каждому изоляту была использована нагрузка пептида в расчёте 40 мкг/диск (около 7,7 нмоль), что по массе эквивалентно содержанию стандартного антимикотика — амфотерицина В. Как видно из полученных данных, NsW2 оказывал антимикотическое действие в отношении двух патогенных клинических изолятов, резистентных к препарату из группы азолов (флуконазолу): *A.ochraceus* 497М и *A.fumigatus* 163м на уровне, сопоставимом с амфотерицином В (табл. 3). Остальные три штамма были нечувствительны к тионину в выбранной концентрации.

Таблица 3. **Антимикотическая активность тионина NsW2 чёрного тмина (*N.sativa*) в отношении клинических изолятов р. *Aspergillus***

Тест-культуры	NsW2	Флуконазол	Амфотерицин В
A.tereus 1133м	0	0	10,8±0,3
A.flavus 905м	0	0	13,7±0,1
A.ochraceus 497м	9,1±0,1	0	10,1±0,4
A.fumigatus 163м	9,4±0,1	0	9,2±0,1
A.niger 219	0	0	14,1±0,4

Обсуждение результатов

В рамках настоящего исследования проведена детальная характеристика антимикробных пептидов, выделенных из семян чёрного тмина (*N.sativa*) и структурно-охарактеризованных [18]. В первую очередь, были изучены свойства данных пептидов на предмет проявления цитотоксического действия на линии опухолевых клеток *in vitro*. Так, цитотоксическое действие данных тионинов на четыре варианта опухолевых клеток было отмечено на уровне $ИК_{50}$ в широком диапазоне (0,36—1,8 мкМ), что определяется, главным образом, типом и происхождением каждой конкретной линии. Полученные данные вполне согласуются с результатами других исследователей по изучению действия растительных антимикробных пептидов из этого семейства, вызывающих цитолитический эффект мембран микроорганизмов [26, 27]. Ранее было показано, что некоторые из растительных тионинов демонстрировали цитолитические и противоопухолевые свойства. Например, тионин из растения омела (*Pyrularia pubera*) (UniProtKB/Swiss-Prot ID: P07504.1) проявлял противоопухолевое действие по отношению к линии клеток HeLa при действующей концентрации 50 мкг/мл (около 10 мкМ), при этом цитотоксичность реализовывалась за счёт явления гемолиза [28]. Отдельного упоминания заслуживает группа тионинов — вискотоксинов из видов рода Омела (*Viscum* spp.) — с шестью (а не восьмью) остатками цистеина, формирующих три (а не четыре) дисульфидные связи, и проявляющие выраженные противоопухолевые и цитотоксические свойства. Данные полипептиды представляют собой подсемейство гомологичных молекул, имеющих компактную шпилечную структуру с двумя α-спиральными участками [29]. Так, вискотоксин B2 из омелы белой (*V.album* L.) проявлял противоопухолевую активность *in vivo* против клеточной линии крысиной остеобластподобной саркомы при $ИК_{50}$ на уровне 1,6 мг/мл [30]. Напротив, другие вискотоксины (A1, A2 и A3) были активны по отношению к лимфоцитам человека, по причине того, что они способны индуцировать генерацию активных форм кислорода (АФК) и увеличение проницаемости клеточных мембран [31]. Во-вторую очередь подробно рассмотрено влияние одного из тионинов (NsW2) на степень экспрессии генов, контролирующих превращение нормальных клеток в злокачественные в клетках рабдомиосаркомы (RD) человека. Ингибирование генов в клетках RD, обработанных тионином семян чёрного тмина, указывает на преимущественную способность этого пептида подавлять экспрессию целой группы генов, которые могут расцениваться как маркеры в процессах онкогенеза. Можно было предположить, что тионин NsW2, эффективно влияя на экспрессию ряда ключевых генов, изменяет и показатели выживаемости клеток.

Известно, что большая роль в онкогенезе принадлежит генам семейства матриксных протеиназ (МПП), принимающих участие в процессах пролиферации, дифференциации, апоптоза, способности разрушать белки внеклеточного матрикса. ММП могут обеспечивать инвазивный рост опухолевах клеток, пенетрацию в лимфоциты и кровеносные сосуды, метастазирование [32]. Активность ММП в подавляющем большинстве случаев контролируется тканевыми ингибиторами матриксных протеиназ (ТИМП), которые способны блокировать разрушение экстрацеллюлярного матрикса, препятствуя развитию опухолей, метастазированию, ангиогенезу. Как было отмечено ранее, ген *RhoA* контролирует широкий спектр клеточных функций, участвует в процессах трансформации, инвазии, метастазирования опухолей, поэтому он рассматривается как потенциальный онкоген [33]. Ген *NFkB* является транскрипционным фактором, регулируя активность генов, контролирующих пролиферацию и выживание клеток. Активирование этого гена различными экзогенными воздействиями (радиация и др.) сопровождается протекторным действием благодаря включению ряда механизмов, в том числе активации системы цитокинов. [34]. Кроме того, общеизвестно, что огромная роль в регуляции генной активности принадлежит микроРНК, количественная экспрессия двух представителей которых нами исследованы: ген *mir21* относится к онкогенам, а *mir34* — к онко-супрессорам [35].

В серии предыдущих работ нами был испытан β-пуротионин Tk-AMP-BP, выделенный из зерна пшеницы (*Triticum kiharae*) [23], который был охарактеризован как активный антимутаген, снижающий более чем на 80% индуцированные хлоридом кадмия повреждения ДНК в клетках человека [36]. Данное соединение демонстрировало выраженное влияние на экспрессию генов, контролирующих процессы трансформации нормальных клеток в злокачественные в клетках синдрома Дауна, характеризующихся высокой предрасположенностью к развитию лейкозов: в 15 раз выше, чем общепопуляционный уровень [37, 38]. Важно отметить, что данный β-пуротио-

нин обладал также выраженной антиоксидантной активностью на уровне экстракта, из которого он был выделен. Большинство антимутагенов обладают также антиканцерогенными свойствами, которые широко изучены при использовании экстрактов растений. Любопытно отметить, что в основном в качестве природных антимутагенов-антиканцерогенов исследуются экстракты растений. Следует подчеркнуть, что гибель опухолевых клеток в наших экспериментах чётко коррелирует с ингибированием экспрессии исследуемых генов, которая в опухолях разной локализации была повышена.

Следовательно, выбор антиканцерогенного объекта может осуществляться путём исследования влияния препарата на экспрессию ключевых генов, вовлечённых в онкогенез. Таким образом, использование тионинов чёрного тмина, водный и спиртовой экстракты которого ранее охарактеризованы как препараты, снижающие индуцированные канцерогенами опухоли у лабораторных животных [15], может расцениваться как новый подход к профилактике и лечению опухолей. В дополнение к этому, регуляция экспрессии большинства онкогенов в представленной выборке при аппликации данного полипептида, также происходит в сторону снижения при действии ионизирующего (рентгеновского) излучения в дозе до 3 Гр и продолжительностью до 4 ч [39].

Новым направлением в изучении антимикробной (антифунгальной) активности растительных антимикробных пептидов на примере семейства тионинов в рамках настоящей работы являлась проверка их действия на подавление роста клинических изолятов различных видов рода *Aspergillus*, которые были выделены при диагностике пневмомикозов у больных туберкулёзом. Основанием для проведения данной работы явилось наличие выраженной фунгицидной активности по отношению к штамму *A.niger* VKM F-33 у дефензинов чёрного тмина, которая детектировалась на уровне $ИК_{50}$ при значении 3,5 мкг/мл (около 700 нМ) [17]. Интересно, что при изучении влияния антимикробного пептида семян звездчатки (*Stellaria media* L.), относящегося к другому семейству защитных пептидов растений — α-гарпининам — был отмечен исключительно фунгистатический эффект (задержка роста мицелия), который не зависел от физиологической стадии самих конидий гриба (покоящиеся/проросшие) [40]. Помимо вида *A.niger*, который входит в патогенный комплекс, вызывающий плесневение зерновок злаковых, другой вид данного рода, который является фитопатогенном — это *A.flavus*. Многие изоляты данного вида являются токсигенными и токсинообразующими. В частности в семенах локализован ряд запасных белков, некоторые из которых (из семейства 2S альбуминов) обладают бифункциональным действием, то есть помимо запасной функции, они реализуют также и защитную [41, 42]. Интересно, что из пяти тестируемых изолятов, активность была статистически достоверно показана только на двух (*A.ochraceus* и *A.fumigatus*), что может свидетельствовать о факте специфического влияния полипептидов только на определённые виды за счёт, вероятно, различающегося состава оболочки (клеточной стенки и/или цитоплазматической мембраны) или регуляции на генетическом уровне. Таким образом, приведённые данные могут являться потенциальной основой, объясняющей наличие у растительных полипептидов антимикробной активности против грибов из рода *Aspergillus*.

В заключении можно отметить, что тионины семян чёрного тмина, или чернушки посевной (*N.sativa*) обладают выраженным цитотоксическим действием в отношении спектра линий опухолевых клеток, способны влиять на уровень экспрессии некоторых онкогенов, участвующих в процессах канцерогенеза, преимущественно в сторону снижения, а также ингибировать рост колоний некоторых клинических изолятов видов возбудителей лёгочных аспергиллёзов, устойчивых к антимикотическим препаратам группы азолов.

Полученные данные указывают на то, что исследованные тионины можно расценивать как перспективные антимикотические соединения с противоопухолевыми свойствами, а их высокая токсичность в целом для разнообразных патогенных клеток служит основанием для создания на их основе биологически активных структурно более простых аналогов, которые могут быть использованы для разработки новых антимикробных соединений [43].

Благодарности

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (проекты №№ 13-03-00050-а, 16-34-60217-мол_а_дк) и Программой Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине». Авторы благодарят сотрудников лаборатории химии белков и пептидов Института биоорганической химии им. А. С. Садыкова Академии Наук Республики Узбекистан д.х.н. Вешкурову О.Н. и Ощепкову Ю.И. за предоставленные обезжиренные семена чернушки, с.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН, к.б.н. Свирщевскую Е.В. за проведение опытов по определению цитотоксичности тионинов чёрного тмина на двух линиях опухолевых клеток; Шишкину А.А. за участие в определении количественного уровня экспрессии онкогенов методом ПЦР «в реальном времени».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stec B.* Plant thionins — structural perspective. Cell Mol Life Sci 2006; 63: 1370—1385.
2. *Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., Thevissen K., De Samblanx G.W., Osborn R.W.* Antimicrobial peptides from plants. Crit Rev Plant Sci 1997; 16: 297—323.
3. *Romero A., Alamillo J.M., Garcia-Olmedo F.* Processing of thionin precursors in barley leaves by a vacuolar proteinase. Eur J Biochem 1997; 243: 202—208.
4. *Epple P., Apel K., Bohlmann H.* An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. Plant Physiol 1995; 109: 813—820.
5. *Stuart L.S. and Harris T.H.* Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein from unbleached wheat flour. Cereal Chem 1942; 19: 288—300.
6. *Bergey D.R., Howe G.A., Ryan C.A.* Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 12053—12058.
7. *Bohlmann H., Vignutelli A., Hilpert B., Miersch O., Wasternack C., Apel K.* Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. FEBS Lett 1998; 437: 281—286.
8. *Vignutelli A., Wasternack C., Apel K., Bohlmann H.* Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. Plant J 1998; 14: 285—295.
9. *Florack D.E. and Stiekema W.J.* Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. Plant Mol Biol 1994; 26: 25—37.
10. *Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-Zárate L., Villagómes-Gómez E., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A.* Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. Biotechnol Lett 2008; 10: 1713—1719.
11. *Steenkamp V., Grimmer H., Semano M., Gulumian M.* Antioxidant and genotoxic properties of South African herbal extracts. Mutat Res 2005; 581: 35—422.
12. *Arashanyan E.B.* Sistemnye kletochnye mechanizmy protivoopucholevoy activnosti rastitel'nych adaptogenov. Voprosy oncologii 2009; 55: 1: 15—22 (in Russian).
13. *Agabeili R.A.* Genetic effects of root extracts of *Glycyrrhiza glabra* L. in different test systems. Cytol Genet 2012; 46: 5: 297—301.
14. *Vasilyeva I.M., Zasukhina G.D.* Comparison of the protective effect of garlic extract and cell defense during adaptive response. Russ J Gen 2002; 38: 3: 335—337.
15. *Linjawi S.A.A., Khalil W.K.B., Hassanane M.M., Ahmed E.S.* Evaluation of the protective effect of *Nigella sativa* extract and its primary active component thymoqunone against DMBA-induced breast cancer in female rats. Arch Med Sci 2013; 10: 1—10.
16. *Ощепкова Ю.И., Вешкурова О.Н., Рогожин Е.А., Мусолямов А.Х., Смирнов А.Н., Одинцова Т.И., Егоров Ц.А., Гришин Е.В., Салихов Ш.И.* Выделение липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной (*Nigella sativa*). Биоорган хим 2009; 35: 3: 344—349. / *Oshhepkova Ju.I., Veshkurova O.N., Rogozhin E.A., Musoljamov A.H., Smirnov A.N., Odincova T.I., Egorov C.A., Grishin E.V., Salihov Sh.I.* Vydelenie lipid-perenosjashhego belka Ns-LTP1 iz semjan chernushki posevnoj (*Nigella sativa*). Bioorgan him 2009; 35: 3: 344—349. [in Russian]
17. *Rogozhin E.A., Oshchepkova Y.I., Odintsova T.I., Khadeeva N.V., Veshkurova O.N., Egorov T.A., Grishin E.V., Salikhov S.I.* Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. Plant Physiol Biochem 2011; 49: 2: 131—137.
18. *Vasilchenko, A.S., Smirnov, A.N., Zavriev, S.K., Grishin E.V., Vasilchenko A.V., Rogozhin E.A.* Int J Pept Res Ther 2016. doi:10.1007/s10989-016-9549.
19. *Климко Н.Н.* Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. М.: Ви Джи Групп, 2008; 336. / *Klimko N.N.* Mikozy: diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlja vrachej. 2-e izd. pererab. i dop. M.: Vi Dzhi Grupp, 2008; 336. [in Russian]
20. *Кулько А. Б.* Атлас условно-патогенных грибов рода Aspergillus - возбудителей бронхолёгочных инфекций. М.: МНПЦБТ, 2012; 160. / *Kul'ko A. B.* Atlas uslovno-patogennyh gribov roda Aspergillus - vozbuditelej bronholjogochnyh infekcij. M.: MNPCBT, 2012; 160. [in Russian]
21. *Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.)* Определитель патогенных и условно патогенных грибов: Пер. с англ. М.: Издательство Мир. 2001; 468. / *Satton D., Fotergill A., Rinal'di M. (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.)* Opredelitel' patogennyh i uslovno patogennyh gribov: Per. s angl. M.: Izdatel'stvo Mir. 2001; 468. [in Russian]
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.0, valid from 2015-11-16, 2015.
23. *Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalsky V.A., Grishin E.V.* Diversity of wheat anti-microbial peptides. Peptides 2005; 26: 11: 2064—2073.
24. *Etienne-Manneville S., Hall A.* Rho GTPases in cell biology. Nature 2002; 420: 6916: 629—635.
25. *Kamai T., Kawakami S., Koga F. et al.* RhoA is associated with invasion and lymph node metastasis in upper urinary tract cancer. BJU Int 2003; 91: 3: 234-238.
26. *Thevissen K., Ghazi A., De Samblanx G.W., Brownlee C., Osborn R.W., Broekaert W.F.* Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. J Biol Chem 1996; 21: 271: 25: 15018—15025.
27. *Thevissen K., Terras F.R., Broekaert W.F.* Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. Appl Environ Microbiol 1999 Dec; 65: 12: 5451—5458.
28. *Evans J., Wang Y.D., Shaw K.P., and Vernon L.P.* Cellular responses to *Pyrularia* thionin are mediated by Ca^{2+} influx and phospholipase A2 activation and are inhibited by thionin tyrosine iodination. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 5849—5853.
29. *Pal A., Debreczeni J.E., Sevvana M., Gruene T., Kahle B., Zeeck A., Sheldrick G.M.* Structures of viscotoxins A1 and B2 from European mistletoe solved using native data alone. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008, 64: Pt 9: 985—992.
30. *Kong J.L., Du X.B., Fan C.X., Xu J.F., Zheng X.J.* Determination of primary structure of a novel peptide from mistletoe and its antitumor activity. Acta Pharmaceutica Sinica 39 (2004) 813—817.
31. *Guzmán-Rodríguez J.J., Ochoa-Zarzosa A., López-Gómez R., and López-Meza J.E.* Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents, BioMed Research International (2015) dx.doi.org/10.1155/2015/735087.
32. *Keller U., Doucet A., Overall C.* Protease research in the era of system biology. Diol Chem 2007; 388: 11: 1159—1162.
33. *Wang Y., Erickson J., Fuji R. et.al.* Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. Cancer Res 2010; 18: 3: 207—219.
34. *Li X., Gao L., Cui Q., Gary B.D., Dyess D.L., Taylor W., Shevde L.A., Samant R.S., Dean-Colomb W., Piazza G.A., Xi Y.* Silindac inhibits tumor cell invasion by suppressing N7kB-mediated transcription of microRNAs. Oncogene 2012; 31: 4979—4986.
35. *Erson-Bensan A.* Introduction to microRNAs in biological systems. MicroRNA biology and computational analysis. Springer Sci. N.Y., 2014; 1107: 1—14.
36. *Одинцова Т.И., Васильева И.М.. Коростылева Т.В., Уткина Л.Л., Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Шиян А.А., Пухальский В.А., Засухина Г.Д.* Антимутагенная активность β-пуротионина Tk-AMP-BP пшеницы. Генетика 2011; 47: 9: 1267—1270. / *Odincova T.I., Vasil'eva I.M.. Korostyleva T.V., Utkina L.L., Slavohotova A.A., Rogozhin E.A., Shijan A.A., Puhal'skij V.A., Zasuhina G.D.* Antimutagennaja aktivnost' β-purotionina Tk-AMP-BP pshenicy. Genetika 2011; 47: 9: 1267—1270. [in Russian]
37. *Засухина Г.Д., Шагирова Ж.М., Бабинцев М.В., Васильева И.М., Рогожин Е.А., Одинцова Т.И., Михайлов В.Ф., Громов С.П., Ведерников А.И., Алфимов М.В.* Модуляция антимутагенами экспрессии генов в клетках человека, различающихся по чувствительности к мутагенам. Доклады Академии Наук, 2013; 453: 1: 99—101. / *Zasuhina G.D., Shagirova Zh.M., Babincev M.V., Vasil'eva I.M., Rogozhin E.A., Odincova T.I., Mihajlov V.F., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Alfimov M.V.* Moduljacija antimutagenami jekspressii genov v kletkah cheloveka, razlichajushhihsja po chuvstvitel'nosti k mutagenam. Doklady Akademii Nauk, 2013; 453: 1: 99—101. [in Russian]
38. *Засухина Г.Д., Шишкина А.А., Васильева И.М., Рогожин Е.А., Михайлов В.Ф., Раева Н.Ф., Шуленина Л.В., Громов С.П., Алфимов М.В.* Сравнительный анализ экспрессии генов в клетках крови и опухолевых клетках человека, обработанных антимутагенами. Доклады Академии Наук 2014; 457: 6: 1—3. / *Zasuhina G.D., Shishkina A.A., Vasil'eva I.M., Rogozhin E.A., Mihajlov V.F., Raeva N.F., Shulenina L.V., Gromov S.P., Alfimov M.V.* Sravnitel'nyj analiz jekspressii genov v kletkah krovi i opuholevyh kletkah cheloveka, obrabotannyh antimutagenami. Doklady Akademii Nauk 2014; 457: 6: 1—3. [in Russian]
39. *Михайлов В.Ф., Шишкина А.А., Васильева И.М., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Рогожин Е.А., Старцев М.И., Засухина Г.Д., Громов С.П., Алфимов М.В.* Сравнительный анализ природных и синтетических антимутагенов как регуляторов экспрессии генов в клетках человека при воздействии ионизирующего излучения. Генетика 2015; 51: 2: 147—155. / *Mihajlov V.F., Shishkina A.A., Vasil'eva I.M., Shulenina L.V., Raeva N.F., Rogozhin E.A., Starcev M.I., Zasuhina G.D., Gromov S.P., Alfimov M.V.* Sravnitel'nyj analiz prirodnyh i sinteticheskih antimutagenov kak reguljatorov jekspressii genov v kletkah cheloveka pri vozdejstvii ionizirujushhego izluchenija. Genetika 2015; 51: 2: 147—155. [in Russian]
40. *Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Andreev Y.A., Oparin P.B., Berkut A.A., Vassilevski A.A., Egorov T.A., Grishin E.V., Odintsova T.I.* Novel antifungal α-hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution. Plant Mol Biol 2014; 84: 1—2: 189—202.
41. *Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Sklyar I.V., Musolyamov A.K., Kudryavtsev A.M., Pukhalsky V.A., Smirnov A.N., Grishin E.V. and Egorov T.A.* Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. Protein & Peptide Letters 2010; 17: 522—529.

42. *Duan XH, Jiang R, Wen YJ, Bin JH.* Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against *Aspergillus flavus*. Plant Physiol Biochem 2013; 66: 84—90.

43. *Vila-Perello M., Tognon S., Sanchez-Vallet A., Garcia-Olmedo F., Molina A., Andreu D.* A minimalist design approach to antimicrobial agents based on a thionin template. J Med Chem 2006; 49: 448—451.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кулько Александр Борисович — к.б.н., в.н.с. отдела проблем лабораторной Диагностики туберкулёза и патоморфологии Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы

Кисиль Ольга Валерьевна — к.х.н., и.о. ученого секретаря ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф.Гаузе», Москва

Садыкова Вера Сергеевна — д.б.н., в.н.с. лаборатории Химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе, Москва

Михайлов Владимир Федорович — к.б.н., заведующий отделом Экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Государственного унитарного предприятия Государственный научный центр Российской Федерации Институт биофизики Федерального Медико-биологического Агентства, Москва

Васильева Ия Михайловна — к.б.н., с.н.с., группы мутагенеза и репараций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва

Шуленина Лилия Викторовна — к.б.н., н.с. отдела Экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Государственного унитарного предприятия Государственный научный центр Российской Федерации Институт биофизики Федерального Медико-биологического Агентства, Москва

Засухина Галина Дмитриевна — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, группы мутагенеза и репараций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва

Рогожин Евгений Александрович — к.х.н., н.с. лаборатории Нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва