



ИТОГОВАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

Федерального государственного бюджетного учреждения
**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ**
Федерального медико-биологического агентства
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА РОССИИ)

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

МОСКВА
15–16 декабря 2015



ИТОГОВАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА РОССИИ

Москва

15–16 декабря 2015

СОДЕРЖАНИЕ

	<i>стр.</i>
Отдел молекулярной биологии и генетики	1
Отдел биофизики	18
Отдел клинико-экспериментальный	22
Клиническая больница № 123	26



ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМА МИКОБАКТЕРИЙ КЛАСТЕРА BEIJING B0/W148

Беспятых Ю.А., Шитиков Е.А., Алтухов И.А., Бутенко И.О., Алексеев Д.Г., Ильина Е.Н.

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

На сегодняшний день актуальным является функциональный анализ информации, реализуемой геномом *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), что возможно с привлечением методов протеомного тестирования, в том числе количественной протеомики. Целью настоящего исследования было описать особенности протеома штаммов *M. tuberculosis* кластера Beijing B0/W148 в сравнении с лабораторным штаммом H37Rv в условиях *in vitro* культивирования.

В исследование были включены 7 штаммов МБТ кластера Beijing B0/W148 и 1 референтный штамм H37Rv. Экстракцию белка из клеток микобактерий проводили согласно разработанной в лаборатории методике. Трипсинолиз проводили в геле согласно описанной ранее методике (Zhiguo, 2010). Безметочное протеомное профилирование белковых экстрактов осуществляли с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра ABSciex TripleTOF 5600 в режиме IDA. Идентификацию пептидов проводили программными пакетами AB SCIEX ProteinPilot v 4.5 и Mascot v 2.2.07. Дальнейшую квантификацию осуществляли с помощью программного обеспечения Progenesis v 4.1.

В общей сложности достоверно идентифицировано 1868 белков для МБТ кластера Beijing B0/W148 и 1560 для штамма H37Rv. Сравнительный количественный анализ штаммов кластера Beijing B0/W148 и H37Rv показал статистически значимые отличия в степени представленности 192 белков ($p < 0.05$). Для дифференциальных белков был проведен Gene Ontology анализ и оценка белок-белковых взаимодействий. Полученные данные указали на характерные для штаммов кластера Beijing B0/W148 повышенный биосинтез жирных кислот и отличные от H37Rv пути реализации ответа на гипоксию. Зафиксированные изменения позволяют сделать предположение о лучшей адаптации штаммов кластера Beijing B0/W148 к выживанию внутри макрофагов.



ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ШАПЕРОНАХ НА МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ *NEISSERIA GONORRHOEAЕ*

Бодоев И.Н., Малахова М.В., Хлебус Э.Ю., Манулов А.И., Алтухов И.А., Алексеев Д.Г.,
Побегуц О.В., Бутенко И.О., Ильина Е.Н., Говорун В.М.

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

Гонорея, вызываемая *Neisseria gonorrhoeae*, занимает второе место в мире среди заболеваний, передающихся половым путем. Ранее нами был исследован клинический изолят i19.05, проявляющий пониженную чувствительностью к спектру антимикробных препаратов (АМП). Генетический анализ не выявил известных детерминант резистентности, однако показал наличие мутации в белке Omp85 и периплазматическом шапероне SurA, ответственных, наряду с Skp и DegQ, за транслокацию белков внешней мембраны. Ранее, путем трансформации реципиентного штамма (n01.08) нами было доказано вовлечение мутантных генов *surA* и *omp85* в формирование фенотипической устойчивости гонококка пенициллину. Целью настоящего исследования было установление сочетанного влияния мутантных форм SurA и Omp85 на представленность белков внешней мембраны. Проведен сравнительный протеомный анализ цитозольной и мембранной фракций, полученных от штамма реципиента (n01.08), донора (i19.05) и трансформанта (NG05). Сопоставление представленности белков мембранной фракции этих штаммов показало многократное увеличение представленности белка шаперона Skp в штаммах i19.05 и NG05, несущих мутантный ген *surA*, по отношению к штамму n01.08. Возможно, это компенсаторный механизм. Кроме того, у этих штаммов заметно увеличение количества различных белков внешней мембраны в том числе PorB, NspA, Omp3 (A) и PilQ, что в свою очередь может изменять на барьерные функции внешней мембраны, приводя к снижению чувствительности к АМП.



МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ДИЗАЙНА GQ-АПТАМЕРОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Цветков В.Б., Варижук А.М., Позмогова Г.Е.

Лаборатория искусственного антителогенеза

Введение химических модификаций в состав олигонуклеотидных лекарств – один из основных приемов, позволяющих снижать их чувствительность к биодegradации и улучшать или направленно модулировать параметры связывания с мишенью. Активность GQ (G-квадруплексных)-аптамеров, в первую очередь, определяется их пространственной организацией. Для направленного дизайна GQ-лекарств необходимо разработать новые методы оценки влияния модификаций на их конформацию и эффективность связывания с мишенями. Влияние на связывание с тромбином ряда модификаций (сахаро-фосфатного остова и локальной замены гетероциклов) ТВА (тромбин связывающий GQ-аптамер) было изучено с помощью процедуры докинга с использованием AutoDock 4.2, и МД-вычислений с применением пакета Amber 10 (Varizhuk, Tsvetkov et al. 2013. *Eur.J. of Med.Chem*; Tatarinova, Tsvetkov et al. 2014. *PlosOne*; Tsvetkov, Varizhuk et al. 2015. *Scientific Reports*). Для детального анализа конформационных перестроек GQ-олигомеров, полученных из МД траекторий, предложена новая система параметров, описывающих геометрию квадруплексов (Tsvetkov, Pozmogova et al. 2015. *J Biomol Struct Dyn*). С целью практической реализации конформационного анализа GQ-олигомеров на базе, предложенной системы параметров, создана программа «GQ parameter calculator» (Цветков В.Б. и др. Св. Гос. Рег. № 2015660969 от 14.10.2015) и успешно применена для описания поведения теломерного GQ и аптамеров на поверхности капсидного белка HIV gp120 (Tsvetkov, Pozmogova et al. 2015. *J Biomol Struct Dyn*; Tsvetkov, Varizhuk, Pozmogova. 2015. *Medchem*). Важно отметить, что прогнозы, полученные на основе расчетов, подтвердились при исследовании физико-химических и биологических свойств синтетических модифицированных GQ-олигомеров (Tatarinova, Tsvetkov et al. 2014. *PlosOne*; Tsvetkov, Varizhuk et al. 2015. *Scientific Reports*; Tsvetkov, Pozmogova et al. 2015. *J Biomol Struct Dyn* и др.).



МЕТАБОЛОМНОЕ И ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВЕЗИКУЛ *BACTEROIDES FRAGILIS*

Ванюшкина А.А., Захаржевская Н.Б., Бутенко И.И., Алтухов И.А.

Лаборатория протеомного анализа

Бактероиды являются представителями нормальной микрофлоры кишечника человека. Однако некоторые виды бактериоидов могут быть патогенны и способны вызывать так называемые анаэробные инфекции у человека. Так, патогенный штамм *Bacteroides fragilis* BOB25 способен вырабатывать энтеротоксин (BFT), стимулирующий дегенерацию эпителиоцитов кишечника человека и способен вызывать диарею. Однако механизм влияния токсигенного штамма *Bacteroides fragilis* на человека исследован не полностью. Интересной особенностью *Bacteroides fragilis* является интенсивное выделение везикул, являющихся единственным описанным механизмом экспорта веществ из клеток. Везикулы могут с легкостью поглощаться эпителием толстой кишки. Мы предположили, что везикулы могут служить механизмом доставки к клеткам эпителия не только токсина, но и других биохимических соединений, способных потенциально влиять на физиологию человек. Качественный и количественный состав везикул бактериоида до сих пор не был полностью исследован.

Для выяснения метаболомно-протеомного состава везикул *Bacteroides fragilis* их выделяли методом ультрацентрифугирования в логарифмической фазе роста культуры. Анализ протеомного состава везикул был произведен методом IDA с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра TripleTOF 5600 (ABSciex), совмещенного с ВЭЖХ системой. Анализ метаболомного состава везикул был произведен методом гидрофильной хроматографии с использованием тройной квадрупольной хромато-масс-спектрометрической системы LCMS/MS-8030 (Shimadzu) в режиме анализа MRM.

В ходе анализа протеома везикул было выявлено более 200 различных белков, входящих в состав преимущественно внешней мембраны бактерии, периплазмы, а также ряд цитозольных белков. Важно, что среди выявленных белков встречались протеазы, гидролазы, а также ряд оксидоредуктаз и пататин. Проникая внутрь клеток, данные белки могут определять существенные изменения физиологии эпителия толстой кишки, воздействуя на потенциальные внутриклеточные субстраты.

В ходе количественного анализа метаболомов везикул *Bacteroides fragilis* были выявлены различия в содержаниях метаболитов токсигенного и нетоксигенного штаммов. Среди них несколько аминокислот и продукты метаболизма нуклеотидов и кофакторов. Дальнейшие эксперименты с изотопно-мечеными метаболитами показали, что эти вещества способны попадать с везикулами в клетки эукариот. Анализ протеома и метаболома везикул открывает новые возможности оценки межклеточных взаимодействий, а определение полного спектра соединений, входящих в состав везикул может способствовать более глубокому пониманию различных функциональных состояний организма человека при контакте с производными бактериальных клеток.



САЙТ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА MraZ В МОЛЛИКУТАХ

Фисунов Г.Ю., Евсютина Д.В., Семашко Т.А., Арзамасов А.А., Манувера В.А., Говорун В.М.

Лаборатория протеомного анализа

Для бактерий класса Молликут характерна общая редукция генома и систем регуляции генов. В настоящей работе обнаружена вторая (после CIRCE-HrcA) консервативная в Молликутах пара транскрипционный фактор – сайт связывания. В настоящей работе мы показали наличие консервативных повторов у многих Молликут в районе промотора кластера генов деления (DCW-кластер), в составе которого содержится ген *mraZ*. Мы получили рекомбинантный белок MraZ из *M. gallisepticum* в *E. coli*. Мы показали, что белок MraZ связывает прямые повторы вида $(AAAGTG[T/G]N_3)_k$, где $k=3$ для большинства Молликут. Сайт связывания MraZ локализуется в промоторе DCW-кластера. Мы рассчитали константу связывания MraZ с сайтом связывания из *M. gallisepticum* дикого типа, которая составила 300 нМ. Мы определили, что MraZ образует гомомультимерный комплекс при взаимодействии с ДНК. Минимальной ДНК-связывающей единицей в таком комплексе является октамер, который взаимодействует с одним повтором. При этом число октамеров, взаимодействующих с ДНК, равно числу повторов, т.е. с последовательностью $(AAAGTG[T/G]N_3)_3$ образуется 24-мерный комплекс. Мы сконструировали вектор для оверэкспрессии MraZ в *M. gallisepticum* на основе транспозона и получили стабильные штаммы-трансформанты. Мы показали, что оверэкспрессия MraZ приводит к активации транскрипции DCW-кластера. При этом у трансформантов происходило удлинение клеток и образование агрегатов, по-видимому, в результате нарушения цитокинеза.



**ПРОТЕОМНЫЙ ОТВЕТ БАКТЕРИИ *Mycoplasma gallisepticum*
НА ВНУТРИТЕЛОЧНУЮ ИНВАЗИЮ И ДАЛЬНЕЙШУЮ ПЕРСИСТЕНЦИЮ
В ЭКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ**

Матюшкина Д.С., Побегуц О.В., Бутенко И.О., Ванюшкина А.А., Аниканов Н.А., Букато О.Н.,
Ладыгина В.Г., Говорун В.М.

Лаборатория протеомного анализа

Mycoplasma gallisepticum относится к бактериям с очень маленьким геномом и может рассматриваться как удобный модельный объект для изучения системной биологии. *M. gallisepticum* является патогенном птиц, инфицирующим респираторный тракт. В данной работе была показана способность *Mycoplasma gallisepticum* S6 проникать в клетки человеческой линии HeLa, линии куриных эритроцитов HD3 и в мышинные эмбриональные стволовые mES клетки с помощью конфокальной микроскопии и гентамицинового теста. Было исследовано две модели инфекции: острая (24 часа) и хроническая (19 дней и 7 недель). С помощью двумерного дифференциального электрофореза с последующим MALDI-масс-спектрометрическим анализом и сравнительного протеомного анализа методом множественных реакций (MRM-MS) с помощью тандемного квадруполь-квадрупольного масс-спектрометра с линейной ионной ловушкой ABSciex QTrap 4500 было выявлено, что при внутриклеточной локализации *M. gallisepticum* изменяет свой протеомный профиль, при котором основные изменения касаются белков, обладающих оксидоредуктазной активностью и обеспечивающих защиту клетки от окислительного стресса, белков гликолиза, регуляторного белка *spxA* и поверхностных Vlh-антигенов. Показано, что репертуар Vlh-антигенов строго зависит от того, является ли инфекция острой или хронической, а также, является ли инвазия в эукариотическую клетку для микоплазмы первичной или бактерия претерпевает повторное попадание в клетку хозяина. Кроме этого, она активизирует пути метаболизма, связанные с утилизацией глицерина и глицерин-содержащих молекул до дигидроксиацетонфосфата, а также реакции образования ацетата из пирувата с участием НАДН-оксидазы, в результате которых образуется пероксид водорода. Предполагается, что он необходим *M. gallisepticum* для внутриклеточной инвазии и персистенции в клетке хозяина.



ТРАНСКРИПЦИОННОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МУТАНТОВ И ОТВЕТА НА ОБРАБОТКУ ИНГИБИТОРАМИ *Mycoplasma gallisepticum*

Семашко Т.А., Арзамасов А.А., Фисунов Г.Ю.

Лаборатория протеомного анализа

Mycoplasma gallisepticum – бактерия, принадлежащая к классу Mollicutes. Она обладает редуцированным геномом и характеризуется отсутствием клеточной стенки и многих метаболических путей. Также *M. gallisepticum* легко культивируется и непатогенна для человека. В связи с этим она является удобным объектом для исследования организации и функционирования прокариотической клетки, в частности, регуляции экспрессии генов. Ранее в нашей лаборатории было проведено транскриптомное профилирование *M. gallisepticum* с использованием высокопроизводительного секвенирования. По его результатам были уточнены аннотированные гены, размечены границы стартов инициации транскрипции, а также идентифицированы антисмысловые РНК.

На основании этих данных нами была разработана ДНК-микроматрица, которая позволяет измерять уровень транскрипции генов с помощью гибридизации. Далее этим методом было проведено транскрипционное профилирование генетических мутантов *M. gallisepticum*, имеющих нокауты по генам некоторых ферментов и потенциальных регуляторов экспрессии, а также стрессовых состояний клетки под действием антибиотиков тетрациклина (ингибитор рибосомального синтеза), новобиоцина (ингибитор ДНК-гиразы), карбонил-цианид м-хлорфенилгидразоном (протонный ионофор) и олигомицина (ингибитор АТФ-синтетазы). Полученные данные позволяют выявить группы генов, совместно меняющих экспрессию, а также предположить возможные объяснения этих явлений.



ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОГО СКРИНИНГА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РНК-БИОМАРКЕРОВ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Никитина А.С.¹, Бабенко В.В.¹, Селезнева О.В.¹, Бабалян К.А.², Пешков М.Н.,
Васильев А.О.³, Говоров А.В.³, Прилепская Е.А.³, Даниленко С.А.⁴, Шарова Е.И.¹,
Кострюкова Е.С.¹

¹Лаборатория постгеномных исследований в биологии; ²МФТИ; ³Кафедра урологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова; ⁴Лаборатория молекулярной генетики человека

В предлагаемом исследовании показана принципиальная возможность поиска потенциальных ранее неизвестных РНК-биомаркеров рака простаты в получаемом малоинвазивными манипуляциями биоматериале - плазме крови и моче. Установлено, что у пациентов с доброкачественной гиперплазией (аденомой) простаты в моче и плазме крови обнаруживается значительное количество РНК-биомаркеров, по литературным данным потенциально ассоциированных с раком простаты. Продемонстрирована зависимость количества обнаруживаемых маркеров от метода транскриптомного профилирования. При этом сам факт присутствия известных РНК-маркеров РПЖ в образцах от пациентов с ДГПЖ может свидетельствовать об их недостаточной специфичности и подтверждает необходимость проведения дальнейших изысканий в этой области.



МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА ПРИ БОЛЕЗНИ КРОНА МЕТАБОЛИЧЕСКИ КОМПЛЕМЕНТИРУЕТ ГЕТЕРОГЕННУЮ *ESCHERICHIA COLI*

Тяхт А.В.¹, Манолов А.И.¹, Каныгина А.В.¹, Кострюкова Е.С.², Ларин А.К.², Карпова И.Ю.²,
Ракитина Д.В.³, Байкова Ю.П.³, Алексеев Д.Г.¹, Говорун В.М.³

¹Лаборатория биоинформатики; ²Лаборатория постгеномных исследований в биологии;

³Лаборатория протеомного анализа

Болезнь Крона ассоциирована с дисбалансом состава кишечного микробного сообщества. В ряде исследований были показаны ассоциации заболевания с присутствием определенных видов, однако до сих пор не ясны механизмы того, как взаимодействие между отдельными бактериальными агентами и остальными членами микробного сообщества вносит вклад в развитие этого заболевания у генетически предрасположенных индивидов. Проведенное многоцентровое исследование микробиоты при болезни Крона с использованием метагеномного секвенирования выявило аномальный состав сообщества у пациентов, характеризующийся, в частности, повышенной относительной представленностью вида *Escherichia coli*. Реконструкция профиля наличия дополнительных генов из метагеномных данных, проведенная для данного вида, показало значительное геномное разнообразие, что расширяет традиционный стереотип адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC), ассоциированной с болезнью Крона. Системный анализ метаболического потенциала микробиоты показал, что *E. coli* является краеугольным видом в составе сообщества, удерживающимся за счет метаболической поддержки от разбалансированного сообщества. Предположительно, наличие этих внутренних обратных связей затрудняет элиминацию данного вида, тем самым внося вклад в развитие и тяжесть заболевания.



БЕЗРЕФЕРЕНСНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

Дубинкина В.Б.¹, Ульяновцев В.И.³, Казаков С.В.³, Ищенко Д.С.^{1,2}, Тяхт А.В.^{1,2}, Алексеев Д.Г.^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (Государственный университет), лаборатория системной биологии; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, лаборатория биоинформатики; ³Университет ИТМО, международная лаборатория «Компьютерные технологии»

В условиях стремительно накапливающихся объемов геномных данных необходимо иметь методы получения их сжатого представления (feature extraction). Они позволят эффективно решать задачи классификации, кластеризации и моделировать выявленные зависимости с целью генерации и проверки биологических гипотез. Один из наиболее challenging объектов – геномные тексты про среду - метагеномы, для которых, ввиду наличия неизвестных составляющих, особенно интересно применять безреференсные методы анализа.

Среди таких методов, наиболее простым и эффективным для первичного анализа является безреференсное сравнение последовательностей путем определения попарных расстояний между ними на основе k -мерных спектров (векторов частот встречаемости каждого k -мера - олигонуклеотида длины k - в рядах образца). В нашей работе было изучено соответствие попарных расстояний на основе k -мерных спектров (для коротких k -меров ($5 \leq k \leq 11$)), различным традиционно применяемым reference-based методикам, на основании большого массива метагеномов населения из разных стран мира. Было выявлено различие бета-разнообразия полученного по k -мерному и таксономическому составу и высокое сходство с функциональным составом.

Для более высоких значений k ($25 \leq k \leq 31$) был разработан метод оценки бета-разнообразия путем объединения k -меров в группы - компоненты графа де-Брейна. Метод основан на упрощенной совместной сборке и позволяет анализировать сотни метагеномов одновременно. Тестирование на наборе хорошо изученных метагеномов показало высокое сходство бета-разнообразия полученного на основе таксономического профилирования и нашего метода. Детектируемые разработанными методами отличия от reference-based результатов анализа показывают, что k -мерные подходы могут служить комплементарными методами для выявления существенных особенностей состава, дающими ценную информацию о присутствии неизвестной бактерии, вируса или многоклеточного организма.



МЕТАМУТ: ФОРМАЛИЗМ ОПИСАНИЯ МЕТАГЕНОМНЫХ ВАРИАЦИЙ

Коварский Б.А., Алексеев Д.Г., Ищенко Д.С., Ярыгин К.С., Тяхт А.В.

Лаборатория биоинформатики

Метагеномные данные несут в себе биологическую информацию, которая не может быть получена традиционными методами бактериальной геномики. Важным фактом является концептуальная сложность описания анализа метагеномных данных. Для преодоления этой сложности нами в рассмотрение введен новый объект - матрица MetaMut, матрица метагеномных вариаций. С ее помощью любой метагеномный анализ сводится к набору действий над этой матрицей, который легко формализуются. Эффективность нашего подхода демонстрируется на анализе мутационных горячих точек в геномах бактерий кишечного микробиома, а также на анализе эпистаза.



АВТОМАТИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ: ЧАСТНЫЕ СЛУЧАИ И ШИРОКОМАСШТАБНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Манолов А.И., Каныгина А.В., Клименко Н.С., Васильев А.С., Шичкова П.А., Коварский Б.А., Алексеев Д.Г.

Лаборатория биоинформатики

Для проведения массового анализа бактериальных геномных последовательностей необходим инструмент, функционирующий по принципу конвейера. Мы разработали вычислительный конвейер, на вход которого поступают исходные данные секвенирования. На выходе предоставляется информация о штамме взятом самом по себе (генный состав, представленность метаболических путей, вероятные факторы вирулентности), информация, которую можно получить благодаря сравнению с другими штаммами вида (наличие и состав геномных островов, филогенетическое отношение с другими штаммами), а также информацию о виде в целом (размер кор-генома, открытость пан-генома, частота гомологичной рекомбинации). Широкомасштабное применение части разработанного нами конвейера ко всем публично доступным полногеномным последовательностям из базы Patric выявило значительную вариабельность в частотах гомологичной рекомбинации для разных бактериальных видов и при этом заметную согласованность данного показателя с таксономическим деревом.



**ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ РАКЕ
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ
INFINIUM HUMANMETHYLATION450 BEADCHIP**

Генерозов Э.В., Захаржевская Н.Б., Шарова Е.И., Даниленко С.А., Бабикова Е.А., Ларин А.К.
Лаборатория молекулярной генетики человека

С использованием технологии ДНК чипов Infinium HumanMethylation450 BeadChips был проанализирован количественный статус метилирования ДНК в 12 парных образцах аденокарциномы предстательной железы и морфологически не измененной ткани. Анализ дифференциально метилированных регионов генома показал ассоциацию с патологическим статусом для 21610 гиперметилированных и 3852 гипометилированных CpG сайтов. Доминирование в раковом геноме гиперметилированных сайтов и их преимущественная локализация в регуляторных областях генов свидетельствуют об их вероятной роли в реализации механизмов генной супрессии в патогенезе рака предстательной железы (РПЖ). Для 14 генов в исследованном массиве были охарактеризованы максимальные показатели гиперметилирования в промоторной области (>50% CpG сайтов) в сочетании с высокими различиями в уровне метилирования между клиническими группами (>40%). Роль гиперметилирования в некоторых из них: AOX1, KLF8, ZNF154, TMEM106A в патогенезе РПЖ уже была показана ранее. Гиперметилирование в генах ACSS3, TAC1, TUBA4B, ZSCAN12 ранее не было показано для РПЖ, но охарактеризовано в ассоциации с другими онкологическими заболеваниями. В свою очередь, различия в уровнях метилирования в генах GPRASP1, NKX2-6, ARX, CYBA, EPSTI1, RHCG было задокументировано по результатам ряда полногеномных исследований онкологической направленности, но пока детально не изучено. Для оценки диагностического потенциала эпигенетических маркеров РПЖ была проведена непредвзятая селекция отдельных CpG сайтов наиболее достоверно дискриминирующих опухолевые образцы от группы не опухолевых образцов. В отобранную диагностическую модель, основанную на логистической регрессии вошло 9 CpG сайтов. Валидация модели была осуществлена на независимом массиве данных по метилированию 40 парных образцов РПЖ из проекта Атлас Ракового Генома (TCGA), проанализированных на такой же версии ДНК чипа. Полученные после валидации суммарные показатели диагностической информативности модели (специфичность 95%, чувствительность 97%, площадь под характеристической кривой диагностического теста (ROC) – 0,96) позволяют рассматривать эти CpG сайты в качестве потенциальных маркеров для молекулярной диагностики РПЖ.



РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, ОСНОВАННОЙ НА ЗРЕЛЫХ НЕЙРОНАХ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИПСК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ПАЦИЕНТОВ

Лебедева О.С.^{1,2}, Васина Е.М.³, Некрасов Е.Д.³, Богомазова А.Н.^{1,3}, Честков И.В.¹, Новосадова Е.В.², Иллариошкин С.Н.⁴, Коистинахо Я.⁵, Гривенников И.А.², Лагарькова М.А.^{1,3}, Киселев С.Л.^{1,3}

¹Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России; ²Институт молекулярной генетики РАН; ³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ⁴Научный центр неврологии РАМН; ⁵Университет Восточной Финляндии, Куопио

Болезнь Паркинсона является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием в мире. Болезнь может носить как спорадический, так и наследственный характер. Наиболее часто встречающейся мутацией является аутосомно-доминантная мутация G2019S в гене PARK8, кодирующем киназу LRRK2. С развитием болезни связаны и аутосомно-рецессивные мутации в гене PARK2, кодирующем E3-убиквитин лигазу паркин. В отличие от предыдущего случая, такие мутации приводят к развитию болезни в относительно молодом возрасте (30–40 лет). Изучение наследственных нейродегенеративных заболеваний затруднено из-за отсутствия адекватного модельного объекта. Зрелые нейроны, несущие мутацию, можно получить из соматических клеток пациентов, с использованием технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Нами получена коллекция ИПСК человека из фибробластов кожи пациентов с болезнью Паркинсона с помощью инфекции векторами на основе лентивирусов и Сендай вирусов, несущих гены из «коктейля Яманака» Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc. Была проведена полная характеристика полученных ИПСК и разработан протокол высокоэффективной направленной дифференцировки в нейроны. Данный протокол позволяет замораживать нейрональные предшественники на двух стадиях дифференцировки и получать до 80% тирозингидроксилаза-положительных клеток. Полученные популяции нейронов экспрессируют синаптофизин и электрофизиологически активны, что свидетельствует об их зрелом состоянии. Такие обогащенные культуры позволяют изучать молекулярные основы заболевания без дополнительной очистки целевого типа клеток.



СЕКРЕТ ВАМПИРА. ИЗУЧЕНИЕ СЕКРЕТА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК С ПРИМЕНЕНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ

Лазарев В.Н.¹, Бабенко В.В.², Курдюмов А.С.¹, Графская Е.Н.¹, Широков Д.А.¹, Подгорный О.В.¹, Згода В.Г.⁴, Кострюкова Е.С.², Побегуц О.В.³, Бутенко И.О.³, Аниканов Н.А.³, Ракитина Д.В.³, Ковальчук С.И.³, Манувера В.А.¹

¹Лаборатория геномной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России; ²Лаборатория постгеномных исследований в биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России; ³Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России; ⁴Лаборатория системной биологии ИБМХ

Гирудотерапия, или лечение с помощью пиявок - один из немногих традиционных методов терапии, не утративший актуальности после начала научного этапа развития медицины. Использование медицинских пиявок для лечения самых разных заболеваний человека практиковалось с древнейших времен. К настоящему моменту накоплен большой массив данных, полученных разными методами, о воздействии укусов медицинских пиявок на организм человека. Основной субстанцией, ответственной за эффекты гирудотерапии, является секрет слюнных желез медицинских пиявок (ССЖ). Он представляет собой сложную смесь биологически активных веществ различной химической природы. Важным свойством ССЖ является его идеальная совместимость с компонентами крови человека, которая выработалась в ходе длительной совместной эволюции пиявок и млекопитающих. Тем не менее, огромные пробелы в знаниях о составе пиявочной слюны и ее действии на организм человека порождают антинаучные теории из области "энергоинформационных" и "акваструктурирующих эффектов", что порождает недоверие к самой концепции гирудотерапии и использующим ее врачам.

В нашей работе мы попытались частично восполнить эти пробелы, используя современные методы полногеномного секвенирования, транскриптомного профилирования клеток слюнных желез и глубокий протеомный и пептидомный анализы секрета слюнных желез медицинских пиявок трех видов: *Hirudo medicinalis*, *H. verbana* и *H. orientalis*. Мы получили транскриптомные данные для изолированных с помощью лазерной микродиссекции клеток слюнных желез пиявок трех видов. Для протеомного профилирования ССЖ была разработана оригинальная методика отбора секрета и проведена идентификация содержащихся в нем белков и пептидов с помощью масс-спектрометрии. Одновременно, было проведено полногеномное секвенирование *H. medicinalis*. Интегрируя полученные данные и проводя их тщательный биоинформатический анализ, мы приступили к направленному поиску пептидных и белковых компонентов ССЖ, ответственных за реализацию основных терапевтических эффектов гирудотерапии (снижение свертываемости крови, тромболизис, гипотензивное, антигипоксическое, общее рефлекторное и анальгезирующее действия, дренирующий и липолитический эффекты, восстановление проницаемости стенки сосудов). Основной акцент сделан на поиск новых антимикробных пептидов и белков в слюне медицинских пиявок.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА СЕКРЕЦИИ И ДОСТАВКИ ТОКСИНА ПАТОГЕННОГО ШТАММА *BACTEROIDES FRAGILIS* К ЭУКАРИОТИЧЕСКИМ КЛЕТКАМ

Захаржевская Н.Б., Цветков В.Б., Ванюшкина А.А., Варижук А.М., Ракитина Д.В., Подгорский В.В., Вишняков И.И., Лисицин Ф.В., Гущина Е.А., Говорун В.М.

Лаборатория молекулярной генетики человека

Bacteroides fragilis является частью нормальной микрофлоры толстой кишки, однако его патогенный штамм обуславливает развитие диареи, предположительно, посредством токсина – фрагилизина. При исследовании генома *Bacteroides fragilis* не было выявлено ни одного из известных механизмов секреции, кроме везикулярного трафика, поэтому доказательство факта переноса токсина везикулами, а также определение физико-химических основ взаимодействия фрагилизина с липидами, составляющими основу везикул, было целью настоящей работы. Для определения локализации токсина в составе фракционированного клеточного лизата, а также в препарате везикул *Bacteroides fragilis* был использован метод иммуноголд мечения с последующим анализом препарата посредством ТЭМ. Исследование липидного состава мембраны бактерии было выполнено посредством метода SHOTGUN с использованием квадрупольного времяпролетного масс спектрометра (Q-TOF Maxis, Bruker Daltonics, Germany). Моделирование и последующий докинг фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилхолина (PC) с токсином был проведен посредством программного обеспечения SYBYL X1.2 (Tripos Inc., St. Louis, USA). Анализ интенсивности флуоресценции фрагилизина при добавлении PE и PC был проведен с использованием прибора Chiriscan spectrometer (Applied Photophysics). Определение коэффициента диффузии и подвижности функциональных групп липидов и белка было выполнено методом двумерной DOSY ЯМР с использованием Bruker Avance III 500 MHz NMR спектрометра. Анализ биологической активности везикул, несущих токсин в отношении E-кадгерина клеточной поверхности культуры HT-29 был выполнен с применением метода иммуноблота. Исследование взаимодействия меченых по липидам мембраны везикул и культуры клеток HT-29 было выполнено с использованием флуоресцентной микроскопии (Nikon Eclipse E800 (Nikon, Japan)). В ходе анализа везикул методом иммуноблота и иммуноголд мечения удалось выявить значительное количество токсина в зрелой форме. Исследование фракционированного лизата определило мембранную локализацию фрагилизина. Согласно данным масс-спектрометрии наиболее представленными классами липидов мембраны являлись PC и PE. Моделирование процессов взаимодействия указанных липидов с токсином показало потенциальные гидрофобные и электростатические взаимосвязи длинноцепочечных жирных кислот липидов с активным центром белка, а также возникновение координационных связей между ионом цинка активного центра белка и кислородом, входящим в состав фосфатной и карбонильной групп липидов. Посредством метода тушения флуоресценции было подтверждено взаимодействие указанных липидов и токсина, а также было произведено вычисление констант взаимодействия, равных для PC -



ИТОГОВАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА РОССИИ
Москва 15–16 декабря 2015

$K_d = 16.0 \pm 0.5$ нМ, для PE - $K_d = 16.9 \pm 0.6$ нМ. Методом ЯМР удалось выявить факт взаимодействия белка и липида по изменению соответствующих коэффициентов диффузии, кроме того было показано изменение подвижности для длинноцепочечных жирных кислот липидов, что также подтвердило ранее полученные в ходе моделирования данные о природе взаимодействия липидов и токсина. Биологическая активность везикул, несущих токсин, была подтверждена в ходе эксперимента с клеточной культурой HT-29. Методом иммуноблота была показана время-зависимая деградация E-кадгерина под воздействием везикул токсигенного штамма, а в ходе анализа меченых везикул была выявлена их ассоциация с поверхностью мембраны клеточной культуры HT-29. Таким образом, везикулы были определены, как механизм секреции и доставки токсина к эукариотическим клеткам.



НОВЫЕ УЗЛОВЫЕ ДНК-НАНОСТРУКТУРЫ, ОБРАЗОВАННЫЕ ИЗ I-МОТИВОВ

Баринов Н., Протопопова А., Варижук А., Позмогова Г., Клинов Д.

Лаборатория медицинских нанотехнологий; Лаборатория искусственного антителогенеза

Цитидин-богатые олигонуклеотиды могут собираться в одни из самых экзотических неканонических вторичных структур ДНК, называемые i-мотивами. Эти четырёхцепочечные структуры образованы из двух перекрывающихся параллельно переплетённых дуплексов, которые находятся в антипараллельной ориентации. Мы предлагаем новый принцип укладки i-мотивов, который может быть использован в ДНК-оригами для построения разветвлённых соединений. Мы показали необычное выстраивание одноцепочечных олигонуклеотидов в многомерный i-мотив: С-концы различных олигонуклеотидов связываются друг с другом последовательно, формируя замкнутый межмолекулярный i-мотив с минимальным количеством петель, и не участвующие в образовании i-мотива нуклеотиды выступают в определённых участках. Мы сконструировали серию разветвлённых наноструктур с 2-7 ветвями. Более того, наше исследование объясняет фундаментальный механизм межмолекулярного формирования i-мотивов, и обнаруживает новый тип укладки ДНК.



ДЕЙСТВИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ НА АКТИВАЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *EX VIVO*

Басырева Л.Ю.¹, Жаппарова О.Н.¹, Бродский И.¹, Гусев А.А.¹, Михальчик Е.В.², Гусев С.А.¹

¹Лаборатория морфологии; ²Лаборатория биофизических методов диагностики

Иммуноглобулины для внутривенного введения (IVIg) нашли широкое применение для терапии различных заболеваний, в развитии которых существенную роль играет воспаление и аутоиммунный компонент. В настоящее время показано прямое действие IVIg на нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты. Однако, многие вопросы, связанные с влиянием IVIg на процессы активации нейтрофилов продолжают оставаться не до конца выясненными. В связи с этим мы изучили влияние IVIg на ФМА индуцированную активацию нейтрофилов, которая запускается в условиях TNF- α прайминга и без него в экспериментах *ex vivo* в цельной крови. Полученные нами данные показывают, что ФМА запускает активацию нейтрофилов, которая заканчивается образованием ловушек (NET's). Кроме нейтрофилов в процесс активации вовлечены также эозинофилы и моноциты. В условиях TNF- α прайминга наблюдается увеличение количества NET's. IVIg дозозависимо увеличивают число NET's при последовательном добавлении TNF- α и ФМА. При внутривенном введении IVIg в ходе лечения аутоиммунных и воспалительных заболеваний, при которых отмечается выраженный прайминг нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов, могут возникать условия для увеличения продолжительности циркуляции большего количества ловушек. Это может влиять на процессы свертывания крови и оказывать иммуномодулирующее действие.



СРАВНЕНИЕ ПИГМЕНТИРОВАННЫХ И НЕПИГМЕНТИРОВАННЫХ ВОЛОС: СОДЕРЖАНИЕ ТИОЛОВ И ТРИПТОФАНА В РАСТВОРИМЫХ БЕЛКАХ ДО И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ СВЕТА

Федоркова М.В., Смолина Н.В., Михальчик Е.В., Добрецов Г.Е.

Лаборатория биофизических методов диагностики

Ранее было показано, что под действием УФ света в волосах человека возрастает содержание тиолов в растворимых белках волоса (РБ), предположительно, за счет разрушения дисульфидных мостиков, и снижается флуоресценция триптофана. *Целью работы* было сравнение реакции пигментированных и непигментированных волос животных на воздействие УФ света. *Объектом исследования* являлись образцы шерсти животных черно-белой окраски (кошек, собаки, козлика, лошади). *Методы:* оценивали количество и свойства РБ (содержание тиоловых групп и флуоресценцию триптофана). Часть каждого образца подвергали воздействию УФ света в лабораторных условиях (254 нм, 25 мкВт/см²) и анализировали по той же схеме, что и контрольные (необлученные) волосы. *Результаты:* непигментированные образцы отличались от пигментированных повышенным содержанием тиоловых групп (в среднем в 1,5 раза, $p < 0,05$) и повышенной флуоресценцией триптофана из растворимых белков (на 30%, $p < 0,05$). Воздействие УФ света вызывало более выраженное снижение флуоресценции триптофана в непигментированных волосах (в среднем на 30%) по сравнению с пигментированными волосами (в среднем на 5%). Одновременно под действием УФ света возрастало и содержание тиолов в 2 раза, независимо от пигментации. В модельных исследованиях было показано, что триптофан снижает образование тиоловых групп при воздействии УФ света на раствор окисленного глутатиона. *Заключение:* предполагаем, что триптофан может защищать дисульфидные связи в белках волоса при воздействии УФ света, и существуют механизмы, обуславливающие повышенное содержание триптофан-содержащих белков в стержне волоса непигментированных волос.



МОДИФИКАЦИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ/ГАЛОГЕНИРУЮЩИЙ СТРЕСС

Панасенко О.М., Вахрушева Т.В., Григорьева Д.В.*, Горудко И.В.*, Соколов А.В.,
Костевич В.А.

*Лаборатория физико-химических методов исследования и анализа; *Белорусский
государственный университет, Минск*

Миелопероксидаза (МПО) – фермент, содержащийся главным образом в азурофильных гранулах нейтрофилов и высвобождающийся во внеклеточное пространство в очагах воспаления. МПО катализирует реакцию образования активных форм галогенов (АФГ), способных модифицировать биологически важные молекулы (белки, липиды, нуклеиновые кислоты и пр.), вызывать тем самым цитотоксичность, что приводит к развитию окислительного/галогенирующего стресса. При этом МПО, находясь в очаге воспаления, сама становится мишенью для АФГ. Цель работы – в условиях, моделирующих возникновение окислительного/галогенирующего стресса, изучить особенности модификации ароматических аминокислотных остатков фермента, а также изменение его пероксидазной и галогенирующей активности, сопоставить результаты с бактерицидной активностью МПО. Окислительный/галогенирующий стресс моделировали: 1) путем воздействия на фермент АФГ, образующихся в МПО-зависимых реакциях: HOCl , HOBr , хлор- и бромамины; 2) самоинактивацией фермента в присутствии H_2O_2 и субстратов цикла галогенирования: Cl^- , Br^- или SCN^- . Показано, что инкубация МПО в присутствии HOCl , HOBr или бромамина таурина (МПО:АФГ=1:100, моль/моль) приводила к существенному снижению интенсивности собственной флуоресценции МПО ($\lambda_{\text{возб.}}=285$ нм, $\lambda_{\text{исп.}}=340$ нм), что свидетельствовало о разрушении, соответственно, 45, 45 и 38% остатков триптофана. Самоинактивация фермента в присутствии 140 мМ хлорида или 100 мкМ бромида сопровождалась разрушением, соответственно, 87 и 88% остатков триптофана. После инкубации МПО с HOCl , HOBr или бромамином таурина снижалась как пероксидазная, так и хлорирующая активность фермента, начиная с мольного соотношения МПО:АФГ=1:50 и выше. Хлорамин таурина незначительно снижал активность МПО только при высоких концентрациях (МПО:АФГ=1:1000, моль/моль). Инактивация МПО при функционировании цикла галогенирования снижалась в ряду субстратов: $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{SCN}^-$. Модификация остатков триптофана и инактивация фермента сопровождалась снижением бактерицидной активности МПО (тестировали на лабораторном штамме кишечной палочки *E. coli* DH52). Полученные результаты свидетельствуют о том, что модификация аминокислотных остатков МПО в условиях окислительного/галогенирующего стресса, приводящего к развитию патологических реакций, характерных для очагов воспаления, снижает ее ферментативную активность, что сопровождается угнетением бактерицидной способности МПО.



ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ К-АКТИВИНА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ КОЖИ СВИНЬИ

Белова О.В., Шмелева Е.В., Матюшкина Д.С., Побегуц О.В., Бутенко И.О., Луканидина Т.А., Риппа А.Л., Алтухов И.А., Зимина И.В., Москвина С.Н., Алексеев Д.Г., Косых А.В., Воротеяк Е.А., Сергиенко В.И., Говорун В.М.

Лаборатория молекулярной иммунологии и биохимии; лаборатория протеомного анализа; лаборатория биоинформатики; лаборатория проблем клеточной пролиферации ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН

Разработка получения новых иммуностропных препаратов является актуальной проблемой современной иммунологии. Ранее в нашей лаборатории был создан препарат для лечения псориаза – К-активин, который прошел успешные доклинические испытания и был испытан с хорошим результатом на добровольцах - больных псориазом путем наружного применения. Помимо этого, К-активин влиял на Т- и В-системы иммунитета, на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов человека, проявлял противоопухолевую активность и др. Изучение физико-химических свойств К-активина показало, что он является гетерогенным препаратом и содержит в своем составе белки и РНК. Целью данной работы является частичная очистка и протеомный анализ К-активина. К-активин был выделен и наработан из кожи свиньи по разработанному ранее методу. Применение двух рехроматографий на колонке с сефадексом G-50 позволило избавиться от высокомолекулярных белков, входящих в состав К-активина. Применение трех этапов высаливания сульфатом аммония позволило избавиться от РНК в препарате, что было выявлено методом Шмидта и Таннгаузера. Определение белка по Лоури показало, что его содержание в препарате составляет 100%. Биологическую активность исходного К-активина и препарата после 3-х этапов высаливания проверяли по влиянию на пролиферацию кератиноцитов человека в первичной культуре. И исходный К-активин и препарат после трех этапов высаливания вызывали ингибирование пролиферации кератиноцитов человека. Протеомный анализ проводили с помощью 1Д- и 2Д-электрофореза в полиакриламидном геле с последующей идентификацией белковых полос и пятен с использованием времяпролетного масс-спектрометра UltraFlexII TOF-TOF (BrukerDaltonics, США).. Протеомное профилирование проводили с помощью IDA (данные-зависимых экспериментов) с использованием тандемного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра ABSciexTripleTOF 5600. Были выявлены следующие белки: галектин 1, цистатин А1, тиоредоксин; эпидермальный белок, связывающий жирные кислоты др. В дальнейшем планируется выделение индивидуальных белков.



РЕГИСТР ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА РЕКОРД-3: ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Эрлих А.Д., Грацианский Н.А.

Лаборатория клинической кардиологии

Предпосылки и цель. Регистры острых коронарных синдромов (ОКС) РЕКОРД и РЕКОРД-2 (2007-2011) стали важным источником информации о лечении ОКС в России. Цель РЕКОРДа-3 - оценка настоящего состояния лечения ОКС в российских стационарах и его изменения по сравнению с данными предшествовавших регистров. *Методы.* В РЕКОРД-3 включались пациенты с подозрением на ОКС последовательно госпитализированные в стационары-участники (n=47; 37 городов из 21 региона России, «инвазивные» – 55%) в течение 1 мес в марте-апреле 2015 г. *Результаты.* Включено 2370 пациентов (72% поступили в «инвазивные» стационары, 39% женщин, средний возраст – 64,6 [мин 25, макс 94] года, у 37% - ОКС с подъёмом ST [ОКСпСТ]). Медиана времени от начала симптомов до 1-го обращения - 3,4 ч [межквартильный интервал 1,0-16,8], от 1-го обращения до поступления – 1,5 ч [1,0-3,1]. Доля пациентов, которым определялся тропонин – 76%. Коронарография (КАГ) выполнена у 70% пациентов с ОКСпСТ, у 46% - с ОКС без подъёмов ST (ОКСбпСТ). У 39% пациентов с ОКСпСТ проведено первичное чрескожное коронарное вмешательство (пЧКВ). Доля пациентов с интервалом «дверь-пЧКВ» ≤ 90 мин - 65%. Тромболитическая терапия (ТЛТ) проведена у 32% пациентов (у 51% догоспитально). У 52% после ТЛТ выполнено ЧКВ. Частота реперфузионного лечения при ОКСпСТ - 68%. При ОКСбпСТ ЧКВ проведено у 20% пациентов (из них у 32% - в первые 2, ещё у 32% - от 2 до 24, у 26% - от 24 до 72 ч от поступления). За время госпитализации (медиана – 10 дней) умерло 10% пациентов с ОКСпСТ и 5% - с ОКСбпСТ. Из «неинвазивных» стационаров в «инвазивные» переведены 16% пациентов. *Заключение.* РЕКОРД-3 выявил относительно небольшую частоту пЧКВ, реперфузионного лечения в целом при ОКСпСТ, срочного ЧКВ при ОКСбпСТ. Сравнительно часто пациентам назначались статины, двойная антитромбоцитарная терапия, нефракционированный гепарин подкожно, сравнительно часто они переводились из «неинвазивных» стационаров для КАГ.



ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТУТУСА ПРИ МЯГКОМ КОГНИТИВНОМ СНИЖЕНИИ

Дидковский Н.А., Крынский С.А., Огурцов Д.П., Малашенкова И.К.

Лаборатория клинической иммунологии

В основе болезни Альцгеймера лежат нейровоспаление и нейродегенерация. Несмотря на значительный интерес к изучению механизмов патогенеза ранних стадий болезни Альцгеймера (БА) и мягкого когнитивного снижения (МКС), данные об иммунных нарушениях при этих заболеваниях имеют противоречивый характер. Мы оценивали уровень Th1-цитокинов IL-2 и IL-12, провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TNF α , противовоспалительных белков IL-10 и IL-1RA, фактора роста сосудов эндотелия VEGF, в сыворотке крови пациентов БА и МКС методом ELISA. Обследовано 15 пациентов с поздним началом БА (возраст 79 \pm 2 года), 11 больных с МКС (возраст 74 \pm 8 лет) и 22 добровольца без когнитивных нарушений (возраст 65 \pm 9 лет). Во всех случаях получали добровольное информированное согласие. Для статистической обработки результатов применяли t-критерий Стьюдента. Как при МКС, так и при БА были отмечены признаки системного воспалительного ответа. При МКС отмечалось повышение по сравнению с нормой IL-8 и TNF α и снижение противовоспалительного белка IL-1RA. В группе пациентов с БА отмечалось повышение TNF α , однако уровень IL-8 и других исследованных цитокинов не отличался от нормы. Однако при БА по сравнению с МКС и с контрольной группой добровольцев был повышен уровень IL-12, а также выявлено уменьшение уровня VEGF. Полученные результаты свидетельствуют о признаках иммунного провоспалительного ответа при МКС и БА. Наиболее выраженными они были при МКС и слабее проявлялись у пациентов с БА. Кроме того, особенностью пациентов с поздним началом болезни Альцгеймера было снижение уровня VEGF, говорящее об уменьшении его нейропротективной активности в этой группе, и повышение IL-12. Сывороточный уровень IL-12 у пациентов с когнитивными расстройствами ранее не изучался, но данные, полученные на животных, говорят о возможной роли этого цитокина в прогрессировании нейродегенеративных процессов. Нами планируется изучение уровня провоспалительных цитокинов при МКС в динамике и на фоне терапии.



НЕЛИПИДНЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА У ДЕТЕЙ ЛИЦ С РАННЕЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА. АССОЦИАЦИИ С ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ИХ РОДИТЕЛЯ БЕЗ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

Коннов М.В., Деев А.Д.

Лаборатория клинической кардиологии

Ранее мы сообщали, что в семьях лиц с ранней ишемической болезнью сердца (ИБС) липидные факторы риска (ФР) детей 5-34 лет могут быть ассоциированы с ФР второго родителя без ИБС. Цель этой работы – анализ связи характеристик супругов пробандов с нелипидными ФР их детей.

Методы. Обследованы 200 супругов пробандов (16.8% мужчин) и 268 их детей 5-34 лет. Связи изучены логистической регрессией в 2-х группах детей 5-17 (n=127) и 18-34 лет (n=141) (исключая курение [≥12 лет] и метаболический синдром [МС, ≥16 лет]). **Критерии - источник.** Дети 5-17 лет: избыточная масса тела - IOTF, широкая (≥75 перцентиль) окружность талии (ОТ) - IDF; взрослые дети 18-34 лет: гипертония (АГ) – JNC-7, ожирение – WHO, преддиабет – ADA, МС – JIS.

Результаты. Доли ФР: 20.8 и 23.1 (дети 5-17); 14.4, 12.3, 10.3, 12.4% (18-34 лет), соответственно; курящих – 30.8%. Независимые родительские предикторы курения, АГ, избыточной массы тела, ожирения, широкой ОТ, преддиабета: МС – см. таблицу.

IOTF - International Obesity Task Force, IDF - International Diabetes Federation, ADA - American Diabetes Association, 7-th Report of Joint National Committee on ... High Blood Pressure, JIS - Joint Interim Statement

Нелипидные ФР, возрастные группы детей – лет	Характеристики родителя без ИБС	ОШ	95%ДИ	p
Курение в настоящее время, 12–34	Курение	2.75	1.33–5.70	0.006
	Более низкое образование	1.60	1.08–2.39	0.021
АГ, 18–34	Более высокое образование	2.20	1.11–4.40	0.025
Избыточная масса тела, 5–17	ОТ, см	1.05	1.01–1.08	0.006
Ожирение, 18–34	МС	8.22	2.15–31.4	0.002
	Холестерин ЛВП, ммоль/л	0.42	0.00–0.40	0.006
ОТ ≥75 перцентиль, 5–17	ОТ, см	1.07	1.03–1.10	0.000
Преддиабет, 18–34	МС	6.61	1.78–24.6	0.005
	Базальная гликемия, ммоль/л	3.40	1.47–7.88	0.004
МС, 16–34	МС	6.66	2.07–21.4	0.001

Заключение. Результаты отражают вклад родителя без ИБС (супруга пробанда) – в формирование профиля нелипидных факторов риска у детей с лиц с ранней ИБС.



НАШ ОПЫТ ОКАЗАНИЯ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ПОМОЩИ БОЛЬНЫМ С ВТОРИЧНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

Розанов В.Е.

Клиническая больница № 123

Представлен опыт хирургического лечения 212 больных с вторичным перитонитом, возникшим на почве деструктивных процессов и травм полых органов брюшной полости. Местный перитонит выявлен в 30,7% случаев, распространенный (диффузный – в 41,5%, разлитой – в 27,8%) – в 69,3%; серозный – в 26,9%, серозно-фибринозный – в 42,0%, гнойный – в 31,1%; абдоминальный сепсис – в 8,6%, тяжелый абдоминальный сепсис – в 5,4%, инфекционно-токсический шок – в 4,1%

В зависимости от хирургической тактики пациенты распределены на две группы. Традиционные методы хирургического лечения перитонита были применены у 109 (51,4%) больных (I группа), с применением высокотехнологичной помощи (видеолапароскопии, лазерных, плазменных, ультразвуковых технологий) – в 103 (48,6%) (II группа).

Сравнительный анализ результатов традиционных вмешательств и операций, выполненных с использованием видеолапароскопических, лазерных, плазменных, ультразвуковых технологий, при одинаковой тяжести состояния ($19,9 \pm 1,6$ баллов по APACHE-II) и тяжести перитонита ($18,1 \pm 1,9$ баллов по Мангеймскому индексу перитонита) обнаружил улучшение ряда качественных показателей: число осложнений снизилось в 2,5 раза ($p < 0,01$), летальность уменьшилась в 2,1 раза ($p < 0,01$), средний койко-день снизился в 1,9 раза ($p < 0,05$), а сокращение периода трудовой реабилитации было практически двукратным.

Также установлена значимая связь принятия решения об использовании высокотехнологичной помощи с экономической эффективностью традиционного лечения вторичного перитонита ($\chi^2 = 5,88$, $p < 0,002$).

Таким образом, применение дифференцированной хирургической тактики при различных формах вторичного перитонита в зависимости от этиологии, распространенности, тяжести, использовании видеолапароскопических, лазерных, плазменных, ультразвуковых технологий, позволяет улучшить результаты лечения.



МОЛЕКУЛЯРНАЯ И БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Нелюбин В.Н., Черненко Т.В., Макаренко Г.И.

Клиническая больница № 123

В повседневной клинической практике чрезвычайно важно иметь объективные данные об этиологии инфекционных осложнений при различной патологии. В этом отношении бактериологические исследования имеют чрезвычайно важное значение. Определение вида микроорганизма, его устойчивости к антимикробным препаратам позволяют выбрать тактику ведения пациентов с данной патологией и включить эффективный антибиотик в схему лечения каждого конкретного пациента. Однако, бактериологические исследования занимают длительное время (от 3 до 7 суток, а иногда и более). Такой временной период может оказаться критичным для пациента. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет выявить гены, кодирующие устойчивость микроорганизмов к антибиотикам в короткие сроки (от 3 до 6 часов с момента получения биологического материала). Сочетание бактериологического метода и ПЦР может существенно сократить сроки принятия решения о назначении того или иного антимикробного препарата. Проведено обследование 119 пациентов с различной патологией и развившимися гнойно-септическими осложнениями. Одновременно с посевом на питательные среды методом ПЦР выявляли наличие генов, обуславливающих устойчивость микроба к определенным группам антибиотиков. Определяли гены VIM, NDM, OXA-48 (резистентность к карбапенемам), а так же гены CTX-M, MecA (резистентность к цефалоспорином) и гены TEM, VanA и VanB (резистентность к пенициллинам, ванкомицину и тейкопланину). Использовали наборы реагентов производства фирмы «Литех». Наличие генов, обуславливающих резистентность к антибиотикам, было выявлено в 58,8 % случаев. На основании полученной информации врачам-клиницистам выдавались рекомендации о назначении антибиотика уже в первые часы выявления инфекционного осложнения.

На втором этапе бактериологическим методом определяли вид микроорганизма и его чувствительность к антибиотикам. Исходя из полученных данных проводилась коррекция антибиотикотерапии. Такой подход позволил сократить сроки принятия решения о назначении антибиотика до 6–8 часов.



ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ФМБА РОССИИ

Сарманаев С.Х., Ахметов И.Р.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Токсикологический центр

Ухудшение токсической ситуации в стране (продолжающийся рост химического загрязнения внешней среды, высокий уровень профессиональной заболеваемости химической этиологии и смертности от острых отравлений, рост угроз химического терроризма и т.д.) обусловило принятие Государственной политики по химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года, реализация которой возлагается на Федеральное медико-биологическое агентство, в том числе, Токсикологический центр ФМБА России.

Основным направлением работы Токсикологического центра является организация экстренного медицинского обеспечения стратегических направлений развития промышленности страны (Роскомос, Росатом, Россудостроение и пр.), в том числе непосредственная курация объектов по уничтожению химического оружия.

В результате более чем 10-тилетней деятельности Токсикологического центра ФМБА России сложилась методология решения задач по оказанию экстренной специализированной токсикологической помощи как в консультативной форме, так и в виде оказания непосредственной практической помощи "на местах". Тем не менее, следует указать на имеющуюся насущную необходимость освоения и внедрения в клинику современных медико-биологических достижений в области токсикогеномики, иммуно-, нанотоксикологии и др.