



**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-клинический центр физико-
химической медицины имени академика Ю. М. Лопухина
ФМБА России»**

**ИТОГОВАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

20 - 21 декабря 2022,

www.rcpcm.org

Москва, Малая Пироговская, 1а

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

ИНГИБИРОВАНИЕ SF3B1, КАК НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

К.С. Ануфриева, В.О. Шендер, М.М.Лукина, П.В.Шнайдер, О.М.Иванова, Г.П. Арапиди

Лаборатория системной биологии

В последнее время в научной литературе всё больше внимания уделяется новому классу противоопухолевых агентов, направленных на ингибирование функции сплайсосомы. Эффективность этих препаратов была показана для лечения различных типов злокачественных новообразований. Было доказано, что эти молекулы эффективно устраняют опухолевые клетки в условиях, как *in vitro*, так и *in vivo*. Мишенью многих сплайсинговых ингибиторов является белок SF3B1 (Пладиенолид Б, Сплайсостатин А, E7107). SF3B1 - является основной и незаменимой частью мРНК U2, он участвует в стабилизации связывания U2 с сайтом ветвления. Отсюда следует, что ингибиторы сплайсинга должны приводить к полному включению всех интронов из последовательности пре-мРНК, однако по литературным данным ингибиторы сплайсосомы вызывают изменения сплайсинга, а не его полное подавление. Чтобы выявить молекулярный механизм действия сплайсинговых ингибиторов, объясняющий высокую противоопухолевую активность, мы провели мета-анализ данных РНК секвенирования опухолевых клеточных линий после воздействия различных ингибиторов сплайсинга. Результаты нашего мета-анализа показали, что в независимости от типа сплайсингового ингибитора и в независимости от типа рака, из которого была получена клеточная линия, происходит уменьшение экспрессии около 2 тыс. генов. Функциональный анализ выявил, что транскрипты, белки которых участвуют в репарации двойных разрывов, являются наиболее супрессированными под воздействием сплайсинговых ингибиторов. Анализ изменения альтернативного сплайсинга показал, что наиболее частым событием сплайсинга является вырезание экзона в транскриптах, белки которых также участвуют в репарации двойных разрывов. На основании биоинформатического анализа мы показали, что найденные нами события вырезания экзонов приводят к сдвигу рамки считывания и возникновению преждевременных стоп-кодонов, которые провоцируют нонсенс-зависимый распад. Более того, анализ данных новорастущих РНК показал, что сплайсинговые ингибиторы приводят к увеличению паузы Pol II в промоторных регионах генов, участвующих в репарации двойных разрывов. Запаздывание Pol II приводит к уменьшению скорости синтеза РНК, транскрибируемых с этих участков. Таким образом, результаты нашего исследования показали, что транскрипты, белки которых участвуют в репарации двойных разрывов, являются основными мишенями для ингибиторов SF3B1.

Работа поддержана Грантом РНФ 22-15-00462

ЭНДОСКОПИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ НОСОГЛОТКИ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ СРЕДНИМ ГНОЙНЫМ ОТИТОМ

Баранов К.К., Котова Е.Н., Вязьменов Э.О.

Отделение оториноларингологии КБ 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА РОССИИ
Кафедра оториноларингологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им.
Пирогова Минздрава России

В наши дни наблюдается высокая заболеваемость хроническим средним гнойным отитом (ХГСО) среди детей. Значимым фактором, вызывающим сокращение периода ремиссии и увеличение количества обострений ХГСО у детей, является патология лимфоидного аппарата носоглотки. Эндоскопическая техника позволяет точно определить степень гипертрофии аденоидов, оценить состояние глоточного устья слуховой трубы и проводить аденотомию под контролем зрения.

Цель исследования – анализ эффективности применения эндоскопической техники в диагностике и лечении заболеваний лимфоидного аппарата носоглотки у детей с ХГСО.

Материалы и методы. На базах отделения оториноларингологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА РОССИИ и кафедры оториноларингологии педиатрического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова был проведен анализ результатов рентгенологического, эндоскопического исследования носоглотки и выполненных аденотомий под контролем эндоскопа у 120 детей.

Результаты. 120 детям с периодическими обострениями ХГСО, проведено эндоскопическое исследование носоглотки: у 72 детей (60%) выявлена гипертрофия аденоидов 3 степени, вызывающая тубарную дисфункцию, у 30 детей (25%) обнаружены аденоиды 2 степени, блокирующие глоточные устья слуховых труб. После проведения эндоскопической аденотомии у 92 детей (90.2%) не наблюдались обострения ХГСО в течение 1 года.

Таким образом, Диагностическая эндоскопия носоглотки надежный метод определения степени гипертрофии аденоидов и блока глоточных устьев слуховых труб. Последующее удаление увеличенной аденолимфоидной ткани под эндоскопическим контролем является достоверным способом снижения частоты обострений ХГСО у детей.

ПЕРВОЕ В МИРЕ ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ТРАХЕИ НА ОСНОВЕ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ, ПЕРФОРИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ.

Барановский Д.С.^{1,2}, Клабуков И.Д.^{1,2}, Красильникова О.А.¹, Балясин М.В.²
Крашенинников М.Е.², Люндуп А.В.², Паршин В.Д.³

1 – ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России

2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН)

3 - ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России

GMP-лаборатория клеточных технологий

ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России

Введение и актуальность проблемы: Создание скаффолдов, поддерживающих быструю ревитализацию и обеспечивающих функционирование тканеинженерных конструкций - одна из актуальных задач, стоящих перед современной тканевой инженерией. Модификация тканей для создания тканеинженерных конструкций трахеи в основном осуществлялась воздействием различных химических и физических способов. Однако все предложенные методы создания скаффолдов не позволяли обеспечить полноценную их ревитализацию клетками, что, в свою очередь, не позволяло ранее заявить о создании эффективной биоинженерной конструкции, пригодной для использования в рамках клинических исследований.

Цель: впервые в мире изучить биосовместимость и эффективность тканеинженерной конструкции стенки трахеи на основе кадаверного хряща трахеи человека, подвергнутого лазерной перфорации, и назальных хондроцитов в доклиническом исследовании.

Материалы и методы: Фрагменты хрящевых колец подвергали лазерной перфорации импульсным излучением CO₂-лазера. Перфорированную ткань ревитализировали клетками кролика. Формировали обширный дефект передне-боковой стенки трахеи кролика. Дефект реконструировали имплантацией тканеинженерной конструкции. Контрольной группе животных выполняли имплантацию скаффолдов. Животным выполняли КТ шеи и грудной клетки через 4 недели после операции. Через 8 недель после операции выполняли микро-КТ эксплантированной трахеи и морфологическое исследование конструкции.

Результаты: Спустя месяц после имплантации отмечалось восстановление стенки без признаков стеноза. Микро-КТ через 2 месяца не выявила признаков деформации конструкции. В контрольной группе отмечалась интенсивная резорбция скаффолда с пролабированием стенки органа. Морфологическое исследование выявило полную эпителизацию внутренней поверхности имплантата. Иммуногистохимическое исследование подтвердило эпителиальное происхождение клеток.

Обсуждение и заключение: Созданная конструкция способна эффективно замещать утраченную часть трахеи в длительном эксперименте. Ревитализация назальными хондроцитами препятствует преждевременной резорбции скаффолда, таким образом, имплантация конструкции не приводит к трахеомалиции или стенозу трахеи в отдаленном периоде.

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА И ИОННОЙ СИЛЫ РАСТВОРА НА КОНФОРМАЦИЮ МОЛЕКУЛ ГИАЛУРОВАНОЙ КИСЛОТЫ

Н.А. Баринов^а, Е.В. Дубровин^{а-б}, Д.В. Клинов^а

Лаборатория медицинских нанотехнологий

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Адсорбция биополимеров играет большую роль в различных биологических процессах, а также используется в биотехнологии, например, при создании биосенсоров. Исследование отдельных молекул биополимеров, адсорбированных на поверхность подложки, является важным для понимания структуры и свойств этих молекул. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет анализировать морфологию отдельных молекул биополимеров с субнанометровым пространственным разрешением и оценивать ряд характеристик, включая размер, конформацию, гибкость, персистентную длину.

В данной работе с помощью АСМ охарактеризованы морфология, конформация и гибкость отдельных молекул гиалуроновой кислоты (ГК) в различных условиях. Проанализирована зависимость персистентной длины ГК от состава и ионной силы раствора, а также предложена физическая интерпретация наблюдаемых зависимостей.

ИЗМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФОРМЫ ЛИПИДОВ МЕМБРАНЫ ЛЕЖИТ В
ОСНОВЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
МИТОХОНДРИОНАЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ UCP1 и ANT1.

Башкиров П.В.

Лаборатория электрофизиологии

Окислительный стресс и активные формы кислорода (АФК) являются причинами многих заболеваний. Помимо прямой модификации белков, приводящей к нарушению их функционирования, АФК могут вызывать химическую модификацию мембранных липидов, такую как образование аддуктов фосфатидилэтаноламина (ФЭ) с реактивными альдегидами (РА) и повышенное производство лизолипидов. ФЭ-аддукты потенцируют протонофорную активность белка 1 (UCP1), но лежащий в основе этого молекулярный механизм остается неясным. Здесь мы связали АФК-опосредованное изменение формы липидов с эластичными свойствами мембраны и функцией белков митохондрий UCP1 и аденин-нуклеотид транслоказы 1 (ANT1). Мы обнаружили, что лизофосфатидилхолины и ФЭ-аддукты вызывают одинаковые изменения упругих свойств модельных липидных бислоев, имитирующих внутреннюю митохондриальную мембрану, и одинаково увеличивают протонофорную активность обоих белков. Кроме того, МД моделирование показало, что модифицированные РА липиды и лизолипиды изменяют профиль латерального давления мембраны в одном и том же направлении и в одном и том же диапазоне; изменения были противоположны изменениям, вызванным ФЭ, что указывает на то, что аддукты ФЭ-РА действуют как липиды с положительной спонтанной кривизной. Оба результата указывают на то, что окислительный стресс должен уменьшать упругое напряжение во внутренней митохондриальной мембране. Таким образом, мы пришли к выводу, что UCP1 и ANT1 чувствуют локальное напряжение мембраны и предложили новый регуляторный механизм для функции этих белков.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК МОЗГОВЫХ ОРГАНОИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИПСК БОЛЬНЫХ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИЕЙ 17-ГО ТИПА

Богомазова А. Н.¹, Давиденко А. В.¹, Беликова Л. Д.¹, Еремеев А. В.¹, Лебедева О. С.¹, Ануфриева К. С.², Вигонт В. А.³, Катуква К. А.⁴, Муджири Н. М.⁴, Емелин А. М.⁵, Деев Р. В.⁵, Усатова В. С.⁸, Иллариошкин С. Н.⁶, Лагарькова М. А.¹.

¹ Лаборатория клеточной биологии; ² Лаборатория системной биологии

³ Институт цитологии РАН; ⁴ Институт неврологии РАН; ⁵ Северо-западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова; ⁶ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России

Изучение молекулярных механизмов нейродегенеративных заболеваний затруднено из-за малой доступности тканей мозга, подверженных патологическим изменениям. Кроме того, диагноз зачастую устанавливают тогда, когда ткани мозга необратимо повреждены. По этой причине перспективным инструментом для изучения наследственных нейродегенеративных заболеваний стали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), полученные от пациентов с верифицированным диагнозом. ИПСК способны к дифференцировке во все типы клеток, включая нейральные. Кроме того, дифференцирующиеся ИПСК способны к трёхмерной самоорганизации с воспроизведением тканевой архитектуры, то есть, ИПСК можно использовать для получения трёхмерных структур – органоидов, в том числе мозговых органоидов. Таким образом, благодаря ИПСК можно изучать клетки и ткани, наиболее подверженные патологическим изменениям при нейродегенеративных заболеваниях, при этом можно детектировать наиболее ранние проявления болезни, выявление которых ранее было невозможно.

В данной работе мы изучали ультраструктурные, функциональные, молекулярно-генетические особенности нейронов и клеток мозговых органоидов, полученных из ИПСК пациентов со спиноцеребеллярной атаксией 17-го типа (SCA17). SCA17 – это редкое наследственное нейродегенеративное заболевание, вызванное аномальным увеличением САG-повтора в кодирующей части гена *TBP*. Такая мутация приводит к аномально увеличенному полиглутаминовому тракту в белке TBP, являющемуся транскрипционным фактором, экспрессирующимся во всех клетках организма. Несмотря на повсеместную экспрессию гена *TBP*, патологическим изменениям подвержены только клетки головного мозга.

В нейрональных клетках мозговых органоидов SCA17, полученных из ИПСК, мы при помощи электронной микроскопии выявили множественные морфологические аномалии митохондрий. Проточная цитометрия с применением потенциал-зависимых флуоресцентных красителей митохондрий продемонстрировала, что митохондрии в нейронах SCA17 обладают аномально повышенным потенциалом. Структурные и функциональные нарушения, наблюдаемые в митохондриях нейронов SCA17, сопровождаются небольшим, но достоверным повышением экспрессии группы генов, кодирующих белки митохондрий, и, в частности, тех генов, которые кодируют белки цепи окислительного фосфорилирования.

Таким образом, тремя разными методами нами получены свидетельства в пользу того, что наиболее ранними патологическими проявлениями болезни при SCA17 являются изменения в митохондриях нейронов.

НУКЛЕОЗИДНЫЕ АНАЛОГИ – МОДУЛЯТОРЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ФАЗ

N-БЕЛКА SARS-COV-2

Светлова Ю.И., Книжник Е.К., Манувера В.А., Широков Д.А. Аралов А.В., Матюгина Е.С., Варижук А.М.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Для водных растворов нуклеокапсидного белка (N) SARS-CoV-2 характерно формирование плотных, но подвижных конденсатов типа “жидкость в жидкости” в присутствии вирусной РНК. Предполагается, что подобное разделение фаз в цитоплазме клетки хозяина значимо для репликации SARS-CoV-2 и его уклонении от иммунной системы. При делеции в N, снижающей его склонность к фазовым переходам, происходит восстановление противовирусной защиты клетки-хозяина (реактивация ряда сигнальных путей и формирование стрессовых гранул). В этой связи модуляторы образования конденсатов N-РНК представляют интерес в контексте противовирусной терапии. На данный момент известно два биосовместимых синтетических модулятора (низкомолекулярное соединение и пептидомиметик), показавших активность в модельных системах и имеющих перспективы практического применения.

Целью данной работы была оценка влияния нуклеозидных/нуклеотидных аналогов из числа известных противовирусных агентов на конденсаты N-РНК. Предпосылками к рассмотрению нуклеозидных аналогов послужили результаты недавних исследований чувствительности вирусных конденсатов к концентрации АТФ, который можно назвать основным эндогенным модулятором фазовых переходов биополимеров. Для проверки оказываемых нуклеозидными аналогами эффектов была разработана актуальная модель конденсатов. Ее отличие от описанных ранее моделей состоит в выборе фрагментов РНК. Были рассмотрены фрагменты генома SARS-CoV-2, которые содержат узнаваемые N элементы первичной и вторичной структуры, тогда как в предыдущих исследованиях использовались преимущественно олигорибонуклеотиды случайного состава.

Формирование конденсатов с меченым N в условиях, имитирующих физиологические, регистрировали методами флуоресцентной микроскопии и турбидиметрии. Валидировали модель, сопоставляя ожидаемые и наблюдаемые эффекты рН, ионной силы раствора, а также контрольных известных модуляторов. По данным флуоресцентной микроскопии конденсатов, полученных после инкубации смеси N-РНК с растворами нуклеозидных аналогов, рассчитывали коэффициент разделения N, площадь конденсатов и ряд других параметров для количественной оценки разделения фаз. Эффективность разделения соотносили с противовирусной активностью на клетках.

Для нуклеозидных аналогов нескольких классов (5`-норкарбоциклические (NorC) производные и флексимеры) была отмечена ковариация модуляции конденсатов и противовирусной активности. В случае ненуклеозидных модуляторов – производных перилена, активность которых обусловлена действием на клеточную мембрану, подобной ковариации не наблюдалось. Лидерами из числа нуклеозидных аналогов оказались NorC-производные, увеличивающее эффективность разделения фаз N в 11-15 раз. Ожидается, что в клетке подобные изменения приведут к нарушению жизненного цикла вируса. Примечательно, что модуляция вирусных конденсатов – первый и на данный момент единственный предложенный механизм действия NorC, поскольку более традиционные варианты (ингибирование полимеразы) исключены в виду особенностей химической структуры. Результаты могут быть использованы в дальнейшей разработке терапевтических агентов, адресованных к конденсатам N-РНК, однако потребуются дополнительная проверка селективности соединений в отношении вирусных конденсатов в сравнении с немембранными органеллами клетки-хозяина.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МД-5000.2022.3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАТИОННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ

Вахрушева Т.В., Соколов А.В., Мороз Г.Д., Смирнов И.П., Графская Е.Н., Лацис И.А., Панасенко О.М., Лазарев В.Н.

Лаборатория физико-химических методов исследования и анализа

Катионные антимикробные пептиды (КАМП) привлекают к себе внимание как перспективные противоинфекционные препараты, в отношении которых у бактерий почти не развивается резистентность. КАМП являются составной частью врожденного иммунитета во всех живых организмах. С практической точки зрения особый интерес вызывают синтетические короткие КАМП, производство которых будет проще и дешевле. В деле предсказания и синтеза аминокислотных последовательностей, даже превосходящих натуральные аналоги по антимикробной активности, избирательности и стабильности, достигнут большой успех. Как правило, при оценке их пригодности для введения в организм ограничиваются анализом их цитотоксичности. Однако практически отсутствуют исследования взаимодействия КАМП с биологически важными белками. Целью нашей работы стало взаимодействие КАМП с миелопероксидазой (МПО). В исследовании включены четыре КАМП, сконструированные на основе биоинформатического анализа, примененного к геному микробиома медицинской пиявки. МПО – фермент, присутствующий в основном в нейтрофилах, – обладает уникальной способностью катализировать образование НОС1 и других высокорекреакционных продуктов, повреждающих и убивающих микробы. Местом совместного нахождения КАМП и МПО будут очаги инфекции, куда стекаются нейтрофилы, при активации которых секретруется МПО. Для анализа влияния КАМП на активность МПО использовали спектры поглощения активного центра МПО и методы измерения пероксидазной и хлорирующей активностей МПО с помощью флуорогенных субстратов Amplex Red и Celestine Blue В. Обнаружено, что пептид Nm-AMP2 ускорял обороты фермента, а пептиды rept_1545 и Nm-AMP8 ингибировали как пероксидазную, так и хлорирующую ферментативную активность через механизмы, включающие разные типы ингибирования. Nm-AMP8 проявил более сильное ингибирующее свойство. Константа ингибирования K_i по отношению к субстратам МПО H_2O_2 и Cl^- составила 0,3 – 0,4 мкМ и 11 – 20 мкМ для Nm-AMP8 и rept_1545, соответственно. Было продемонстрировано участие пептидных остатков тирозина и цистеина в механизмах наблюдаемых эффектов пептидов. В процессе исследований возникла гипотеза о роли КАМП как субстратов МПО в подавлении активности МПО, которая, с одной стороны, важна для антимикробной функции этого фермента, но, с другой стороны, мишенью продуцированных МПО активных форм кислорода и галогенов служат и биомолекулы, клетки и ткани организма-хозяина. Полученные результаты говорят о возможной двойственной роли КАМП как антибактериальных агентов и регуляторов активности МПО и предлагают использование КАМП как прототипов при разработке ингибиторов МПО.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА И ТАКТИКА НАБЛЮДЕНИЯ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМ СТРИДОРОМ

Вязьменов Э.О., Баранов К.К., Котова Е.Н.

Отделение оториноларингологии КБ 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА РОССИИ
Кафедра оториноларингологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им.
Пирогова Минздрава России

Стридор - шумное дыхание, обусловленное прохождением турбулентного потока воздуха через суженный участок дыхательных путей. Стридор является наиболее частым симптомом патологии верхних дыхательных путей. По данным различных авторов он отмечается в большинстве случаев у детей с врожденной патологией гортани и при этом примерно у 35-67% пациентов присутствует с рождения.

Цель исследования оценить современные возможности диагностики, дифференциальной диагностики и тактики наблюдения детей с врожденным стридором.

Материалы и методы: в анализ включены 37 детей с врожденным стридором. У некоторых пациентов помимо стридора отмечалась дисфония, симптомы дыхательной недостаточности и нарушение акта глотания. Всем больным выполнена трансназальная диагностическая эндоскопия гортани с использованием фиброларингоскопа Pentax (Япония). Дети были осмотрены неонатологом и невропатологом.

Результаты: в большинстве случаев (43%) основной причиной врожденного стридора являлась ларингомаляция. Присутствовал высокотональный инспираторный стридор. Выявлена четкая связь между выраженностью стридора и типом инспираторного коллапса. Наиболее выраженные симптомы наблюдались у ребенка 7 дней с ларингомаляцией III типа. В связи с тяжестью дыхательных нарушений троим детям была выполнена эпиглоттопексия. На втором месте среди причин возникновения врожденного стридора по нашим данным являлся ювенильный респираторный папилломатоз (11%) и гемангиома гортани (11%). Врожденный стридор также присутствовал при врожденных парезах, кистах, мембранах и расщелине гортани. Дисфония различной степени присутствовала у 42% пациентов. Дыхательные расстройства отмечались у 8 (21%) больных, двое из которых были трахеотомированы. Нарушение акта глотания выявлено у 7 (19%) больных.

Выводы: При любых проявлениях врожденного стридора, дисфонии, обструкции верхних дыхательных путей и неоднократных аспираций необходимо обследование гортани в кратчайшие сроки. При удовлетворительном общесоматическом состоянии новорожденного ребенка выполнение трансназальной фиброларингоскопии рекомендовано в течение 1 месяца.

МАССОВЫЙ ПРОТЕОГЕНОМНЫЙ РЕАНАЛИЗ ОБЩЕДОСТУПНЫХ ПРОТЕОМНЫХ ДАННЫХ: ПОИСК ПЕРЕКОДИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В РЕЗУЛЬТАТЕ РНК-РЕДАКТИРОВАНИЯ

Гончаров А.О.¹, Левицкий Л.И.², Иванов М.В.², Ключникова А.А.^{1,3}, Пятницкий М.А.^{1,3}, Горшков М.В.², Мошковский С.А.¹

¹Лаборатория протеогеномики

²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе

³Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича

Редактирование РНК с заменой аденозина на инозин – одна из самых распространенных посттранскрипционных модификаций. У человека обнаружено порядка 20 тысяч событий редактирования, которые происходят в кодирующей последовательности мРНК и приводят к аминокислотной замене в кодируемом белке. Но подавляющее большинство исследований, посвященных РНК-редактированию, сосредоточено на изучении транскриптомных данных.

Мы разработали протеогеномный пайплайн для реанализа 40 общедоступных наборов панорамных протеомных данных из различных тканей человека. Данные включали более 8000 отдельных ВЭЖХ-МС/МС экспериментов, из которых в итоге было отобрано 5442 .raw файла. Весь объем этого реанализа был сосредоточен на поиске событий редактирования, их кластеризации в образцах различного происхождения и классификации. Всего было идентифицировано 33 сайта перекодирования в 21 наборе данных. Из них 18 сайтов были обнаружены по крайней мере в двух наборах данных, представляющих основной эдитом белков человека. В соответствии с работами предшествующего уровня техники было обнаружено, что нервные и раковые ткани обогащены перекодированными белками. Количественный анализ показал, что перекодирование специфических сайтов напрямую не зависит от уровня экспрессии белков ADAR или самих белков-мишеней. По всей видимости, интенсивность перекодирования обеспечивается дифференциальной и пока не описанной регуляцией взаимодействия фермента с мРНК. Девять сайтов перекодирования, консервативных между человеком и грызунами, были подтверждены таргетным протеомным анализом с использованием изотопно-меченых пептидных стандартов в коре головного мозга и мозжечке мышей, а дополнительный сайт был подтвержден в спинномозговой жидкости человека.

ПРОТЕОГЕНОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КРОН-АССОЦИИРОВАННЫХ АИЕС-ИЗОЛЯТОВ ПОЗВОЛЯЕТ СФОРМУЛИРОВАТЬ МЕХАНИЗМ ОБРАТИМОГО ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ ИХ ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ

Побегуц О.В., Галямина М.А., Семашко Т.Ф., Евсютина Д.В., Ковальчук С.И., Еремеев А.В., Квон Д.А., Горбачев А.Ю.

Лаборатория протеомного анализа

Болезнь Крона (БК) является тяжёлым хроническим иммуноопосредованным гранулематозным воспалительным заболеванием желудочно-кишечного тракта. До сих пор не ясен механизм развития БК, непонятно, что является причиной болезни и что способствует ее развитию. Предполагается, что одной из причин является увеличение количества *Escherichia coli* (*E. coli*), которые способны успешно проникать через муциновый слой, прикрепляться к клеткам эпителия, преодолевать эпителиальный барьер, выживать и реплицироваться внутри макрофагов. Их активность сопровождается высвобождением провоспалительных цитокинов. *E. coli*, обладающие такими свойствами, были отнесены к специфической группе адгезивно-инвазивных патобионтов (АИЕС). В последнее время всё больше появляется свидетельств о том, что *E. coli* могут приобретать вирулентные свойства в организме хозяина, где факторы окружающей среды активируют экспрессию генов вирулентности, переключая миролюбивый фенотип комменсальных штаммов *E. coli* на агрессивный.

Предполагается, что существует феномен долгосрочной эпигенетической памяти, поддерживающий вирулентный или невирулентный фенотипы в зависимости от среды культивирования. Такой феномен был недавно идентифицирован в исследовании энтеропатогенной *E. coli* (ЕРЕС), где было показано, что на эпигенетическом уровне работает переключатель, контролирующий бимодальность вирулентных свойств ЕРЕС. В предыдущих исследованиях нами был обнаружен подобный феномен для изолятов *E. coli*, полученных от пациентов с БК (БК-изолятов). Мы показали, что один и тот же штамм можно обратимо переключить в два противоположных по вирулентным свойствам состояния в зависимости от источника углерода. Пропионат натрия индуцирует формирование гипервирулентного фенотипа, тогда как глюкоза, наоборот, способствует резкому снижению вирулентных свойств.

Для изучения возможного механизма описанного фенотипического переключения мы провели сравнительный транскриптомный и протеомный анализы трех клинических АИЕС-изолятов при культивировании на низкопитательной среде (M9) в двух различных условиях: с добавлением в качестве единственного источника углерода - (i) глюкозы (невирулентный фенотип) или (ii) пропионата натрия (вирулентный фенотип). Поскольку *E. coli* демонстрирует чрезвычайно высокую изменчивость геномов для разных изолятов и большой размер пангенома (более 20 тысяч генов), мы также провели полногеномное секвенирование для всех исследуемых изолятов, для уточнения и повышения полноты анализа транскриптома и протеома.

В результате проведенного биоинформатического анализа данных комбинированного протеогеномного профилирования исследуемых АИЕС-изолятов нами был сформулирован гипотетический механизм обратимого переключения вирулентности, подтверждаемый литературными данными и требующий дальнейшей экспериментальной верификации.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОИСКА ВАРИАЦИЙ ПО ЧИСЛУ КОПИЙ В ГЕНОМЕ

В.Д. Гордеева, Е. И. Шарова, Г.П. Арапиди

Лаборатория системной биологии

В настоящее время полноэкзомное секвенирование (WES) считается оптимальным для геномного анализа с точки зрения информативности и стоимости, и широко используется как для популяционных исследований, так и клинической диагностики. В первую очередь это касается коротких вариаций, таких как однонуклеотидные варианты и инсерции/делеции. Анализ изменения копийности локусов (CNV) также может быть проведен с помощью WES на основе информации о покрытии целевых регионов, однако существуют трудности, связанные с эффективностью обогащения, прочтением регионов с низкой сложностью и др. На данный момент было разработано около 20 инструментов для решения этой задачи, однако вопрос эффективности этих подходов до сих пор остается актуальным. В рамках этой работы нами была предложена схема унифицированного сравнения. Анализ выполнялся на уровне экзонов, а валидационный набор CNV был сформирован путем интеграции общедоступных данных для эталонного образца NA12878. Было показано, что алгоритмы неравнозначны – каждый из них имеет определенный диапазон детектируемых длин, а результаты предсказаний плохо согласуются между собой. Большинство алгоритмов ориентировано на поиск ограниченного числа CNV длиной от одного до семи экзонов, доля ложноположительных результатов не выше 50%. EXCAVATOR2, exomeCopy и FishingCNV способны идентифицировать широкий спектр вариаций, однако показывают низкую точность. В целом, WES чувствительно к обнаружению менее протяженных CNV по сравнению с хромосомным микроматричным анализом (ХМА), который является тестом первой линии для диагностики причин врожденных пороков развития и умственной отсталости у детей. Для оценки целесообразности замены хромосомного микроматричного анализа на WES, мы провели сравнения результатов предсказаний ClinCNV с данными чипов на выборке из 45 человек. Из 6 CNV, охарактеризованных как патогенные, 4 были обнаружены по данным WES (пересечение более 50%). Анализ ложноотрицательных вариантов показал, что одной из причин неверной идентификации может служить дизайн. При сравнении распределения зондов микрочипа и целевых регионов по геному мы выявили 198 белок-кодирующих генов, для которых детекция по данным WES ограничена из-за недостаточного покрытия. 144 из них ранее были ассоциированы с пороками развития, онкологическими заболеваниями, аутизмом, сахарным диабетом, нейропатией и др. Также мы отметили низкую точность детекции CNV в полиморфных регионах генома.

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ПЦР-СИСТЕМЫ ДЛЯ БЫСТРОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТАКСОНОМИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Городничев Р.Б.¹, Корниенко М.А.¹, Беспярых Д.А.¹, Малахова М.В.¹, Селезнева О.В.²,
Веселовский В.А.², Багров Д.В.³, Зайчикова М.В.¹ Шитиков Е.А.¹

¹Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

²"Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии"

³Лаборатория медицинских нанотехнологий

Надвигающийся кризис в лечении бактериальных инфекций, вызванный увеличением доли резистентных изолятов, требует разработки новых подходов к антимикробной терапии. Одним из возможных решений может быть терапия бактериофагами и/или их производными. Однако поиск и описание новых бактериофагов – долгий и трудоемкий процесс. Целью данного исследования являлась разработка схемы первичного скрининга вирулентных фагов *S. aureus* и *K. pneumoniae*, потенциально пригодных для терапии, и ее валидация на лабораторной коллекции бактериофагов.

Геномы фагов (n = 749) были загружены из базы NCBI RefSeq/GenBank. Аннотацию проводили с помощью Prokka. Таксономическое положение фагов определяли на основании ICTV Master Species List 2021v2 и с использованием vConTACT2. Анализ ортологичных генов проводили с помощью PIRATE, далее рассматривали гены с идентичностью >60% и средней длиной >400 п.н. Праймеры подбирали с использованием программы OLIGO. Валидацию ПЦР-систем проводили на лабораторной коллекции фагов (стафилофаги (n = 6); фаги клебсиелл (n = 22)), для которых также было проведено полногеномное секвенирование на платформе Illumina. Капсульный тип штаммов *K. pneumoniae* определяли секвенированием гена *wzi*. Рекомбинантный белок полисахарид-деполимераза получали с использованием вектора pGD и *E. coli* T7 Express *lysY/Iq* в качестве штамма-продуцента. Очистку проводили с использованием ионообменной хроматографии.

В результате анализа 749 геномов бактериофагов было подобрано 13 пар праймеров, способных дифференцировать два семейства вирулентных фагов *S. aureus* и 11 родов вирулентных фагов *K. pneumoniae*. Валидация праймеров *in vitro* на имеющейся коллекции бактериофагов показала способность подобранных праймеров разделять бактериофаги на основании их таксономического положения. Четыре бактериофага *K. pneumoniae* коллекции не определялись разработанной системой праймеров. Из них три фага относились к умеренным и были не пригодны для терапии, четвертый относился к семейству *Zobellviridae*. Бактериофаг был первым представителем этого семейства, способным заражать и лизировать *K. pneumoniae*, и согласно BLASTn имел идентичность около 5% с ближайшими известными бактериофагами. При более детальном анализе было определено, что бактериофаг являлся подовирусом (диаметр капсида 66 нм), геном которого не кодировал генов интеграз, токсинов и факторов вирулентности, что позволяет применять бактериофаг в терапии. Бактериофаг имел в качестве рецептор-связывающего белка полисахарид-деполимеразу и лизировал штаммы *K. pneumoniae* с капсульным типом KL20, однако продуктивный лизис показывал только на штамме-хозяине. Рекомбинантный белок полисахарид-деполимераза показал свою активность в отношении всех штаммов *K. pneumoniae* с капсульным типом KL20.

Таким образом, была предложена система праймеров для быстрого определения таксономического положения и описан первый бактериофаг *K. pneumoniae* из семейства *Zobellviridae*.

МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИЕ НАНОЧАСТИЦЫ С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ: НАКОПЛЕНИЕ ВО ВКЛЮЧЕНИЯХ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* И АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Графская Е.¹, Ци С.², Юй Чж.³, Шен Н.², Федина Е.⁴, Масютин А.^{5,6}, Ерохина М.^{5,6},
Лепойтевин М.³, Лазарев В.¹, Зигангирова Н.⁴, Серре К.³, Дурьманов М.^{2,5}
Лаборатория геномной инженерии

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. ЛОПУХИНА ФМБА России

² Московский физико-технический институт (НИУ)

³ Институт пористых материалов Парижа, Национальный центр научных исследований

⁴ Национальный центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

⁶ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза

Металлоорганические наночастицы (nanoMOFs) являются многообещающим классом гибридных наноматериалов для биомедицинских применений. Некоторые из них, включая биоразлагаемые пористые карбоксилаты железа, недавно были предложены для инкапсуляции и контролируемой доставки антибиотиков. Высокая емкость для загрузки лекарств, способность к биодegradации и быстрая кинетика интернализации делают такие наночастицы перспективными для лечения внутриклеточных бактериальных инфекций по сравнению с антибиотиками, которые плохо накапливаются внутри клеток из-за неспособности преодолевать мембранные барьеры или низкой внутриклеточной задержки. Однако интернализация наночастиц не обеспечивает их накопления в внутри патогена. В представленной работе мы оценили применимость наночастиц MIL-100(Fe), выполненных из мезопористого тримезата железа (III), для совместной локализации с внутриклеточным патогеном *Chlamydia trachomatis*. Было выявлено, что частицы накапливаются в хламидийных включениях инфицированных мышинных макрофагов RAW 264.7. Кроме того, наночастицы, загруженные фотосенсибилизатором метиленовым синим, продемонстрировали значительную фотодинамическую инактивацию *Chlamydia trachomatis* в инфицированных клетках RAW 264.7 по сравнению с необработанным инфицированным контролем. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о перспективном использовании наночастиц MIL-100(Fe) для доставки лекарственных средств, что может быть использовано для лечения хламидийных инфекций. Также впервые была разработана фотодинамическая стратегия борьбы с хламидиозом, которая могла бы найти эффективное применение для лечения инфекций слизистых оболочек. Мы считаем, что разработанный подход может быть ценным для лечения персистирующих хламидийных инфекций, поскольку он не основан на ингибировании метаболизма бактерий по сравнению с антибиотиками.

РАЗНООБРАЗИЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНЫМ СООТНОШЕНИЕМ БЫСТРЫХ И МЕДЛЕННЫХ ВОЛОКОН

А.В. Желанкин, Л.Н. Юльметова, Е.И. Шарова, Э.В. Генерозов

Лаборатория молекулярной генетики человека

Целью данной работы являлась оценка разнообразия и дифференциальной экспрессии микроРНК, а также поиск взаимосвязи между микроРНК и экспрессией белок-кодирующих генов в скелетной мышце человека с преобладанием быстрых или медленных волокон.

Материалом для исследования служили образцы ткани латеральной широкой мышцы бедра (*vastus lateralis*), полученные с помощью биопсии иглой Бергстрема от десяти мужчин-спортсменов в возрасте до 40 лет. Спортсмены были разделены на две группы на основе соотношения типов волокон скелетных мышц и типа тренировочной деятельности. В первую группу ($n = 5$) вошли спортсмены на выносливость (стайеры) с преобладанием медленных мышечных волокон. Вторая группа ($n = 5$) включала силовых атлетов или спринтеров с преобладанием быстрых мышечных волокон. Соотношение быстрых и медленных волокон оценивали после иммуногистохимического окрашивания участка ткани первичными антителами к изоформам тяжелой цепи миозина. Из образцов тканей были выделены малые РНК. Библиотеки малых РНК были отсеквенированы с помощью системы *MiSeq* (Illumina, США) с 50 циклами в режиме одноконцевых прочтений. Значения экспрессии микроРНК были рассчитаны как количество прочтений на миллион (*CPM, counts per million*) на основании выравнивания прочтений микроРНК на базу данных *miRBase* с помощью программы *QuickMIRSeq*.

Транскриптомы были предварительно получены для всех образцов с помощью секвенирования РНК, очищенной от рибосомальной РНК. Анализ транскриптомов на расширенной выборке образцов ($n = 23$) выявил 538 дифференциально экспрессированных белок-кодирующих генов (*quasi-likelihood F-test* в *EdgeR*, *FDR-adjusted p-value* $< 0,05$, $\log_2 CPM \geq 0$, $\log_2 FC > 0,5$) между группами с преобладанием быстрых и медленных волокон.

Среднее количество прочтений на образец при секвенировании малых РНК составило 1,09 млн, при этом около 95% прочтений приходилось на микроРНК. В среднем, 80% прочтений приходилось на одну микроРНК *miR-1-3p*, специфичную для мышечной ткани.

Анализ главных компонент (*PCA*) на основе данных секвенирования микроРНК показал, что образцы из двух групп образуют два разных кластера на графике *PCA P1-P2*. Повышение уровней *miR-206*, *miR-501-3p* и *miR-185-5p* и понижение уровней *miR-499a-5p* и *miR-208-5p* было обнаружено в группе с преобладанием быстрых волокон по сравнению с группой с преобладанием медленных волокон (*quasi-likelihood F-test* в *EdgeR*, $p < 0,05$ и $\log_2 FC > 1$). Четыре из этих микроРНК происходили от митронов – участков интронов генов, несущих гены микроРНК, и две из них (*miR-208b-3p* и *miR-499a-5p*) имели сильные корреляции в экспрессии со своими генами-носителями (*MYH7* и *MYH7B*, соответственно). Мишени матричной РНК (мРНК) были найдены для микроРНК со средним значением *CPM* ≥ 20 по данным базы *miRTarBase*, учитывая взаимодействия, которые были экспериментально подтверждены по крайней мере тремя методами. Корреляции между экспрессией микроРНК и их генов-мишеней рассчитывались на основе значений *CPM*. Было выявлено 9 взаимодействий микроРНК-мРНК с высокой отрицательной корреляцией (*Spearman's ρ* $< -0,8$). Была построена сеть взаимодействий между дифференциально экспрессированными микроРНК и их генами-мишенями. На основании данных по корреляции микроРНК и взаимосвязанных с ними мРНК можно предполагать, что изменения в экспрессии микроРНК между сравниваемыми группами в большей степени объясняются изменением экспрессии генов, чем наоборот.

Данное исследование поддержано грантом РНФ № 21-15-00362.

СМЕШАННОЕ ПОРАЖЕНИЕ ПОЧЕК ПРИ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ.

Э.Р.Закаева, А.С. Журавлёва, Л.В.Бычкова, Т.С. Поликарпова.

Кафедра госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и клинической лабораторной диагностики МИ РУДН, г. Москва

В современных условиях неуклонно растет частота и распространенность воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). В клиническом течении язвенного колита (ЯК), относящегося к ВЗК, отмечаются как кишечные, так и внекишечные проявления болезни. Поражение почек и мочевыводящих путей, по данным разных авторов, отмечается у 4 – 23% пациентов с ЯК и относится к редким внекишечным проявлениям. Причины вовлечения почек в патологический процесс при ЯК до конца не изучены. Рассматривается связь почечного повреждения с основным процессом в кишечнике, обусловленного единым иммунологическим механизмом, а также, как результат побочного действия лекарственных препаратов, используемых для лечения ЯК. В статье обсуждается смешанное поражение почек при ЯК:

Больная Ш, 1995 г.р., 18.10.21 г. госпитализирована в нефрологическое отделение ГКБ им. С.С. Юдина для уточнения нозологической основы почечного повреждения. При поступлении жалобы на общую слабость, расстройство стула, наличие примеси крови и слизи в кале на фоне психоэмоционального стресса в конце 2018 г. Обследовалась амбулаторно и неоднократно стационарно: ФГБУ ФНКЦ ФХН – август 2020 г., МКНЦ им. А.С. Логинова – февраль и сентябрь 2021г., где впервые был поставлен диагноз: ЯК, тотальное поражение, подтвержденный морфологическим исследованием. Больная по поводу основного заболевания получала месалазин до 4,8 г/сут, будесонид 9 мг, препараты железа. Выписана с улучшением. Ранее наблюдалась с диагнозом СРК, эрозивного сигмоидита, по поводу чего нерегулярно принимала препараты 5-АСК. С апреля 2019 г. отмечает появление выраженных болей в лучезапястных, плечевых суставах (наблюдалась у ревматолога). Следует отметить, что в марте 2019 г. впервые отмечено незначительное повышение уровня креатинина с нарастанием его в последующем: до 247 мкмоль/л в октябре 2021г. С начала заболевания отмечалась протеинурия от незначительной до 0,5 г/л – 0,2 г/л. в октябре 2021г. Также обращала на себя внимание высокая СОЭ: в пределах 80-89-57 мм/ч с начала заболевания до сентября 2021 г. Объективно (*status praesens*) общее состояние больной средней тяжести. По органам без особенностей. Потери в весе с конца 2018г по настоящее время нет. При обследовании: СОЭ -32, Гемоглобин 92 г/л, железо 4,8 мкмоль/л, креатинин 248,8 мкмоль/л, протеинурия 0,2 г/л. Выполнена нефробиопсия: гранулематозный интерстициальный нефрит. Проведена пульс-терапия МПЗ (1000мг) трижды с хорошим эффектом в октябре, декабре 2021 г., январе 2022г. с последующим приемом метилпреднизолона 24 мг/сутки в течение месяца, с постепенным снижением дозы (1 мг в 3 дня) до полной отмены и мезаванта (3 т/сутки) с хорошим эффектом: СОЭ-10 мм/ч, креатинин - 136 мкмоль/л, исчезла протеинурия. В марте, октябре 2022г. контрольный осмотр пациентки: состояние удовлетворительное, лабораторные показатели в пределах референсных значений, продолжает принимать мезавант 3 т/сут. Рекомендовано диспансерное наблюдение у гастроэнтеролога и нефролога.

ВЫВОДЫ: Гранулематозный интерстициальный нефрит у больной можно рассматривать, как редкое внекишечное проявление ЯК, а нарастание почечной недостаточности, вероятнее всего, связано с токсическим действием препаратов 5-АСК. Улучшение самочувствия и положительная клинико-лабораторная динамика кишечных и почечных поражений после иммуносупрессивной терапии (включающей сеансы пульс-терапии) подтверждают взаимосвязь между повреждением почек и ЯК. Такие пациенты должны находиться на диспансерном учете у нефролога и гастроэнтеролога.

ЛЕТУЧИЙ МЕТАБОЛОМ ВЕЗИКУЛОМА РОДА BACTEROIDES

Кашатникова Д.А.¹, Шагалева О.Ю.¹, Кардонский Д.А.¹, Конанов Д.Н.⁵, Силантьев А.С.¹,
Филатова Ю.В.¹, Ефимов Б.А.^{1,2}, Багров Д.В.³, Евтушенко Е.Г.⁴, Захаржевская Н.Б.¹

¹ Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина
ФМБА России

² Кафедра микробиологии РНИМУ им. Пирогова

³ Лаборатория медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина
ФМБА России

⁴ Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

⁵ Лаборатория математической биологии и биоинформатики НИИ СБМ Роспотребнадзора

Введение. Изучению функциональных особенностей микрофлоры ЖКТ посвящено значительное количество работ. Преимущественно исследования позволяют оценить экскреторные ферментативные возможности представителей основных родов бактерий, с использованием протемно-метаболических методов. Исследование летучей фракции метаболома (ЛФМ) сводится лишь к определению короткоцепочечных жирных кислот, свободно выделяемых бактериями в среду. Тогда как дистанционная экскреторная активность бактерий, выраженная в выделяемых в среду везикулах на уровне летучего метаболома оценивается не в полной мере. В рамках данной работы проведено масштабное метаболомное профилирование ЛФМ основных представителей рода *Bacteroides*.

Материалы и методы. Для исследования везикул были взяты виды рода *Bacteroides*: *B.dorei*, *B.vulgatus*, *B.caccae*, *B.xylanisolvans*, *B.uniformis*, *B.thetaiotaomicron*, *B.cellulosalyticus*, *B.eggerthii*, *B.stercoris*, *B.intestinalis*, *B.clarus*, *B.coprocola*, *B.salyersiae*, *B.fragilis*, *B.finigoldia*. Для всех видов подобраны условия культивации до достижения максимальной плотности для выделения везикул из культуральной среды. Везикулы выделены методом последовательной фильтрации и центрифугирования. Финальные препараты оценены методом ТЭМ и НТА. Препараты везикул отправлены на исследование ЛФМ посредством ГХ/МС Shimadzu QP2010 Ultra с парофазным экстрактором Shimadzu HS-20.

Результаты. Культуральные среды, а также состав газовой среды были подобраны с учетом скорости и интенсивности роста бактерий, в особенности для *B.intestinalis*. Полученные препараты везикул были проверены на чистоту и морфологию методом ТЭМ, которая показала варьирование размеров везикул от 30 до 100 нм. Отдельно проведено исследование везикул методом НТА. Выявлена разница в определяемых методами ТЭМ и НТА размерах везикул, обусловленная, по-видимому, наличием или отсутствием поверхностного полисахарида А. Везикулы всех заявленных видов были исследованы методом ГХ-МС, который был скорректирован с учетом исследуемого препарата. В ходе анализа ЛФМ везикул представленных видов получена значительная разница в соотношении метаболитов, как свободно выделяемых в среду, так и в составе везикул для всех анализируемых видов. Для некоторых видов в составе ЛФМ везикул получены уникальные соединения как с описанной, так и неизвестной биологической функцией.

Выводы. Разработанный протокол выделения везикул и определение качественного соотношения в их составе летучих метаболитов впервые позволяет выявить виды *Bacteroides*, которые продуцируют везикулы с потенциально богатым и разнообразным составом метаболитов.

Работа финансируется из средств гранта: РФФ 21-75-10172

РОЛЬ СПЛАЙСОСОМНЫХ БЕЛКОВ В ОТВЕТЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК

Иванова О. М., Ануфриева К.С., Шнайдер П.В., Арапиди Г.П., Лагарькова М.А., Говорун В.М. и Шендер В.О.

Лаборатория молекулярной онкологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Опухолевые клетки постоянно находятся в динамичном контакте друг с другом и со своим микроокружением. В настоящее время большое внимание уделяется изучению вклада такой межклеточной коммуникации в процесс формирования устойчивости опухолевых клеток к химиопрепаратам. Ранее нами и другими исследователями было показано, что погибающие под действием радио- или химиотерапии опухолевые клетки секретируют различные сигнальные молекулы во внеклеточное пространство, тем самым способствуя выживанию соседних опухолевых клеток и формированию у них более агрессивного и устойчивого к терапии фенотипа. В частности, в секретоме от погибающих под действием химиотерапии опухолевых клеток повышена представленность различных белков сплайсосомы¹⁻³. Экзогенные сплайсосомные белки в составе внеклеточных везикул способны проникать в окружающие опухолевые клетки, однако последующий ход событий такого типа межклеточной коммуникации не ясен. Анализируя наши собственные протеомные данные, данные проекта The Cancer Genome Atlas и различных siRNA скринингов, мы обратили особое внимание на сплайсосомный белок SYNCRIP. Чтобы исследовать роль данного белка в возникновении химиорезистентности клеток аденокарциномы яичников, были проведены протеомный и транскриптомный анализ клеток с и без сверхэкспрессии SYNCRIP через 12 и 24 часа после обработки цисплатином, а также белок-белковая иммунопреципитация SYNCRIP до и через 12 часов после обработки цисплатином. В ответ на цисплатин изменялся сплайсинг генов, участвующих в репарации ДНК. Так, в этих клетках эффективнее, чем в контрольных клетках без сверхэкспрессии, происходит вырезание интронов в пре-мРНК гена экзонуклеазы EXO1, участвующей в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов и двухцепочечных разрывов. В транскриптах генов BRCA1 и XPA наблюдалось более эффективное включение экзонов, важных для функционально активного белка. Кроме того, оказалось, что SYNCRIP регулирует большое количество сплайсинговых событий в опухолях пациентов с аденокарциномой яичника, ассоциированных с плохой выживаемостью и возникновением рецидивов. На белковом уровне в опухолевых клетках со сверхэкспрессией SYNCRIP повышалась представленность белков эксцизионной репарации. Среди белков-партнеров SYNCRIP под действием цисплатина также появлялись белки, участвующие в репарации ДНК (XRCC5, XRCC6 и др.). Все полученные нами омиксные данные свидетельствуют о функциональной значимости сплайсингового фактора SYNCRIP при ответе опухолевых клеток на химиотерапию. По всей видимости, повышенная представленность в клетках белка SYNCRIP облегчает ответ опухолевых клеток на цисплатин, вероятно, за счет активации путей репарации межцепочечных сшивок ДНК.

Работа поддержана Грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

1 Shender VO, Pavlyukov MS, Ziganshin RH, et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(12):3558-3571.

2 Anufrieva KS, Shender VO, Arapidi GP, et al. Therapy-induced stress response is associated with downregulation of pre-mRNA splicing in cancer cells. *Genome Med*. 2018;10(1):49.

3 Pavlyukov MS, Yu H, Bastola S, et al. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors. *Cancer Cell*. 2018;34(1):119-135.e10.

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА В ОТДЕЛЕНИИ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ

Калачнюк Т.Н., Ефанова Н.В., Иванова О.И.

Отделение гастроэнтерологии

Биологическая терапия (БТ) изменила основную стратегию лечения воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) и представления о ее возможностях. Это трудный, но осуществимый путь к минимизации клинической и эндоскопической активности ВЗК у пациентов, резистентных ко всем предшествующим методам терапии. БТ - это новый вектор развития отделения гастроэнтерологии, большая ответственность врача, предрасполагающая к постоянному обновлению знаний и работе в мультидисциплинарной команде. Первые пациенты на БТ ВЗК появились в ноябре 2019 года. В настоящее время под динамическим наблюдением находятся 27 пациентов, из них 16 с болезнью Крона (БК), 11 – с язвенным колитом (ЯК), мужчин 14, женщин – 13, средний возраст пациентов с БК составил $36,3 \pm 12,5$ лет, с ЯК – $47,1 \pm 14,6$ лет. Из числа пациентов с БК 10 (71,5%) перенесли оперативные вмешательства на кишечнике, двое из которых стомированы. Среди пациентов с БК преобладают легкие формы (15 человек – 87,5%), индекс Харви-Брэдшоу не более 6, среди пациентов с ЯК 6 пациентов (46,1%) с легкой формой, индекс Мейо не более 5. Среди общего количества 14 пациентов (52,8%) являлись бионаивными. В лечении использовались препараты ингибиторы фактора некроза опухоли альфа (анти-ФНО) – инфликсимаб и цертолизумаб пегол, антиинтегриновый препарат ведолизумаб и ингибитор ИЛ 12-и ИЛ-23 – устекинумаб. За время лечения ускользание ответа на анти-ФНО отмечалось у 7 пациентов с БК и 4 с ЯК, у 1 пациента с БК во второй линии терапии констатирована первичная неэффективность ведолизумаба. Проанализировав собственный опыт мы пришли к выводам, что ответ на БТ (ведолизумаб) не имеет четкой корреляции с возрастом пациента, его переносимость и частота развития побочных эффектов ниже, чем у анти-ФНО. На фоне ведолизумаба удалось преодолеть гормональную зависимость, однако у не бионаивных пациентов этот процесс требовал больше времени. При использовании БТ у пациентов с БК на достижение ответа на БТ не оказывал влияния объем оперативных вмешательств. Ведолизумаб хорошо переносился коморбидными пациентами, получавших постоянное лечение по другим заболеваниям (ВИЧ, эпилепсия, СКВ). При ускользании эффекта БТ использовались врачебные тактики эскалации дозы и step-down. Таким образом, БТ является эффективным методом лечения ВЗК, позволяющим достигать не только улучшения качества жизни, но и клинической, и эндоскопической ремиссии. Назначение препаратов БТ должно соответствовать клиническим рекомендациям и индивидуальным особенностям течения заболевания с целью попадания в «окно возможностей», улучшая жизненный прогноз.

ОЦЕНКА ИММУННОГО СТАТУСА МЕТОДОМ TREC/KREC У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ПНЕВМОНИИ

Д.А. Кашатникова.¹, Хаджиева М.Б.¹, Сальникова Л.Е.¹

1. Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
2. Лаборатория экологической генетики ИОГен им. Н.И. Вавилова

Введение. Развитие, тяжесть и исход пневмонии зависят от возраста, сопутствующих заболеваний и иммунного ответа хозяина. Одними из частых и серьезных осложнений пневмонии являются острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и сепсис. Для характеристики пневмонии с сопутствующими заболеваниями была проведена оценка диагностической ценности маркеров иммунного ответа методом TREC/KREC у пациентов с внебольничной пневмонией (ВП) и нозокомиальной пневмонией (НП), а также сопоставление полученных экспериментальных данных с результатами теоретического исследования распространенности данной патологии и ее осложнений с использованием ресурса Columbia Open Health Data (COHD).

Материалы и методы. Теоретическое исследование с использованием ресурса Columbia Open Health Data (COHD) способствовало получению данных о распространенности патологии, а также оценке клинических данных из доступных электронных медицинских карт. Экспериментальное исследование включало исследование иммунного ответа методом TREC/KREC, основанном на применении мультиплексной ПЦР в реальном времени у молодых людей (18–40 лет) с ВП (n = 164) или НП (n = 99) и у группы здорового контроля (n = 170)

Результаты. Доступный в базе COHD набор данных, включающий клиническую оценку течения пневмонии за 5 лет, был представлен анамнестическими данными от 1790431 пациента, среди которых 31783 пациента с пневмонией, 16269 с сепсисом и 1143 с ОРДС. Согласно анализируемым данным, были выявлены сопутствующие заболевания, среди которых первое место занимали болезни системы кровообращения. Возрастное распределение для групп пневмония/сепсис и пневмония/ОРДС показало, что дети первых лет жизни представляют высокий (пневмония) или крайне высокий (сепсис и ОРДС) процент больных с этими состояниями. В возрасте от 10 до 20 лет число больных минимально. В группе 20-70 лет наблюдается постепенное нарастание возрастной распространенности пневмонии и сепсиса. Резкий рост числа больных пневмонией и сепсисом отмечен в возрастной группе 90+. Иммунный ответ хозяина, измеренный с использованием метода TREC/KREC в копиях/ 10^5 клеток, показал более низкие значения TREC в контроле, по сравнению с пациентами с ВП, и выше, чем у пациентов с НП (p-value 1.95×10^{-15} и 4.95×10^{-3} , соответственно). Уровни KREC были выше в контроле, чем у пациентов с НП, и не отличались между контролем и пациентами с ВП (p-value 7.92×10^{-10} и 8.3×10^{-2} , соответственно). При сравнении уровней TREC и KREC при пневмонии различной степени и тяжести исхода, при тяжелом течении значения были ниже, чем при более легком (p-value 5.03×10^{-6} и 6.99×10^{-5} , соответственно). Низкие уровни TREC и KREC были ассоциированы с развитием НП, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса/септического шока и летального исхода, соответствующие прогностические индикаторы составили: AUC_{TREC} в диапазоне 0,71-0,82, AUC_{KREC} в диапазоне 0,67-0,74.

Выводы. При изучении всех исследуемых групп было показано высокое разнообразие уровней TREC и KREC. Пациенты с ВП имели повышенный уровень TREC по сравнению с контролем, что, вероятно, отражает защитную продукцию тимуса как ранний ответ на инфекцию. Измерения продукции тимуса и костного мозга с использованием анализов TREC и KREC могут быть предикторами развития и исхода как пневмонии, так и других инфекционных заболеваний.

ПРИМЕНЕНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ И НЕСЕЛКТИВНЫХ ГЕМОСОРБЕНТОВ В ЛЕЧЕНИИ АЛЛЕРГИИ

Комов В.В., Кирковский В.В.
Лаборатория клинической иммунологии

Лечение аллергических заболеваний остаётся важной и не всегда решаемой задачей. Это обусловлено сложностью и многофакторностью патогенеза аллергических реакций. Гемосорбция (ГС) в лечении аллергических заболеваний применяется с 70-х годов XX века. В настоящее время имеется линейка специфических и неспецифических сорбентов, применяемых для лечения аллергических и иммунных нарушений. Работа выполнена совместно с ЦНИЛ БГМУ (г. Минск, респ. Беларусь. Зав. – д.м.н., проф. В.В. Кирковский)

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: изучить противоаллергическую активность специфических и неспецифических сорбентов и возможности повышения эффективности лечения аллергических заболеваний за счёт оптимального их использования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Проведен ретроспективный анализ применения ГС в трёх группах больных с обострением хронической крапивницы: в первой группе (n=22) применялся специфический сорбент АНТИ IgE-ГЕМО (НПОДО «Фармавит», респ. Беларусь); во второй группе (n=20) - неспецифический сорбент ВНИИТУ-1 (КТИТУ СО РАН, Россия) или «ГемосБел» (НПОДО «Фармавит», респ. Беларусь); в третьей группе (n=18) – последовательное включение селективного, а затем - неселективного сорбента в едином контуре. Критерием отбора служило также наличие динамического наблюдения сроком не менее 3-х лет после ГС. Группы были сопоставимы по основным клиническим показателям. Оценивались: уровень IgE до и после сорбционной колонки (в третьей группе - дополнительно между сорбентами), на 10 и 30 сутки после ГС; время начала редукции клинических признаков; длительность ремиссии; динамика индекса тяжести (ИТ) перед ГС и на 30 сутки. ГС выполнялась однократно, объём перфузии = 80-130% ОЦК, объём сорбента 70±5мл.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Выраженный клинический эффект наблюдался во всех трёх группах. Снижение уровня IgE до и после сорбента было сопоставимо. Интересен факт повышения уровня IgE после второй угольной колонки, отмеченный у 13 (72%) пациентов третьей группы. Аналогичные тенденции отмечены при применении анти- IgE-терапии препаратом моноклональных антител Омализумаб [А.Г. Чучалин, 2011]. При этом в 1 группе, не смотря на раннее начало редукции крапивницы, к 30 суткам отмечалась тенденция к повышению показателя, чего не наблюдалось в других группах. Также в этой группе достоверно короче была длительность ремиссии: 2,7±0,9 мес. против 11,4±2,8 и 12,2± 4,3 мес. соответственно. Снижение ИТ на 30 сутки было также сопоставимо во всех группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, сорбционная терапия обладает выраженным противоаллергическим эффектом. При этом, эффект селективной сорбции развивается очень быстро, но относительно кратковременный. Клинический эффект неселективной сорбции проявляется медленнее, но сохраняется достоверно дольше. Из этого можно сделать вывод, что для купирования острых аллергических реакций необходимо применение селективных сорбентов, в то время, как для программного применения более показаны неселективные сорбенты. Быстрый и продолжительный эффект даёт применение комбинированных сорбентов, обладающих бимодальными свойствами селективных и неселективных сорбентов. Отмеченный феномен повышения уровня IgE при комбинированных сорбентах связан, по-видимому, с либерацией связанного IgE у сенсебилизированных больных в результате сорбционного взаимодействия.

МОДЕЛИРОВАНИЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, ВЫЗВАННОЙ МУТАЦИЕЙ G2019S В КИНАЗЕ LRRK2, НА ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ

Копылова И. В.¹, Шендер В. О.², Арапиди Г. П.³, Шарова Е. И.⁴, Скородумова Л. О.⁴, Богомазова А. Н.¹, Лагарькова М. А.¹, Лебедева О. С.¹

1 – Лаборатория клеточной биологии; 2 – Лаборатория молекулярной онкологии;
3 – Лаборатория системной биологии; 4 – Лаборатория молекулярной генетики человека

Мутации в гене *PARK8*, кодирующем киназу LRRK2, являются наиболее частой причиной наследственных форм болезни Паркинсона (БП). Киназа LRRK2 вовлечена во множество клеточных процессов, среди которых: поддержание цитоскелета, регуляция везикулярного транспорта, аутофагии, эндолизосомного каскада и т.д. Аутосомно-доминантная мутация G2019S в LRRK2 приводит к конформационной перестройке активного центра фермента и, как следствие, усилению его киназной активности. Хотя повышенная киназная активность LRRK2 рассматривается как фактор патогенеза БП, в понимании молекулярных механизмов этого процесса до сих пор остаются пробелы.

Для создания адекватной клеточной модели, исключая влияние генетического фона пациента на результаты исследования, в нашей лаборатории для линии ИПСК пациента с мутацией G2019S с помощью технологии CRISPR/Cas9 были получены изогенные линии с различными аллельными состояниями гена *PARK8*. Предлагаемая модель основана на постмитотических дофаминэргических нейронах (ДАН), которые были охарактеризованы методами иммуоцитохимии и проточной цитофлуориметрии. По данным секвенирования РНК паттерн генной экспрессии полученных нами ДАН соответствует таковому в ранее опубликованных наборах данных по ДАН, и в полученных нами ДАН высоко экспрессированы маркеры зрелых нейронов и маркеры ДАН.

В зрелых ДАН, дифференцированных из изогенных ИПСК и ИПСК, полученных от здоровых доноров, мы исследовали базальный уровень аутофагии. Нами впервые показано, что, в отличие от других линий изогенной системы, в нейронах с нокаутом *PARK8* аутофагосомы локализованы в сомах, но не в нейритах, а в нейронах с гомозиготной мутацией G2019S аутофагосомы практически отсутствуют. Следующим этапом работы стало изучение функционального состояния митохондрий и митофагии в зрелых ДАН. Было показано, что протонофор CCCP достоверно усиливает митофагию в нейронах изогенной системы, у которых присутствует хотя бы один нормальный аллель гена *PARK8*, но не в нейронах, полученных из ИПСК здоровых доноров, что свидетельствует о большей чувствительности нейронов пациента к стрессовым воздействиям. В то же время дисахарид трегалоза, рассматриваемый как возможное средство вспомогательной терапии БП, стимулирует митофагию во всех клеточных линиях. Кроме того, инкубация с трегалозой повышает митохондриальный мембранный потенциал во всех линиях нейронов, кроме линии, гомозиготной по мутации G2019S.

Постмитотические ДАН, дифференцированные из изогенных ИПСК и ИПСК здоровых доноров, были исследованы омиксными методами (транскриптомный, протеомный и фосфопротеомный анализы). Нами были обнаружены различия в экспрессии коллагенов на транскриптомном уровне между зрелыми ДАН, не содержащими мутацию G2019S в киназе LRRK2, и клетками, имеющими эту мутацию в гомо- и гетерозиготном состояниях. На данный момент мы анализируем полученные протеомные данные. По результатам фосфопротеомного анализа будут предложены возможные ранее не известные партнеры киназы LRRK2 для более детального изучения патологических путей, приводящих к БП. Такой подход позволит выявлять круг потенциальных мишеней для разработки новых лекарственных средств, направленных не только на симптомы, но и на первопричину заболевания.

КИСТЫ НОСОГЛОТКИ У ДЕТЕЙ

Котова Е.Н., Баранов К.К., Вязьменов Э.О.

Отделение оториноларингологии КБ 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА РОССИИ

ФГБОУ ВО РНИМУ им. Пирогова Минздрава России

Носоглоточные кисты – это, в основном, врожденные пороки развития, но их клиническая манифестация может быть и в подростковом, и во взрослом возрасте в зависимости от их тяжести, размера и местоположения. Кисты носоглотки редко встречаются в практике отоларинголога, но могут обнаруживаться при носовой обструкции.

Цель и задачи. Повышение эффективности диагностики и лечения кист носоглотки у детей на основании дифференцированного подхода к проявлению симптомов заболевания.
Пациенты и методы. С 2009 по 2022 г. на клинических базах кафедры оториноларингологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова наблюдалось 29 пациентов (100%) в возрасте от 1 до 8 лет с кистами и кистоподобными образованиями носоглотки (средний возраст детей 4.21 ± 0.39 лет), из них 17 детей (58.6%) были направлены в стационар для проведения аденотомии, и кисты носоглотки у этих пациентов являлись интраоперационными находками. Предоперационное обследование включало эндоскопию, КТ полости носа и носоглотки. **Результаты.** При поступлении дети предъявляли жалобы на носовую обструкцию, переднюю и заднюю гнойную ринорею, храп, снижение слуха. Эндоскопически в 9 случаях (31.03%) в носоглотке определялась гипертрофированная глоточная миндалина, в области тубарного валика - округлое плотно-эластичное образование, с кистозным содержимым, размерами от 0,5 до 1,5 см (рис.1); у 8 детей (27.6%), перенесших ранее аденотомию, визуализировались кисты в области тубарных валиков, в 1 случае (3.5%) в задне-верхних отделах носоглотки - плотное, округлое образование с четкими контурами, содержащее воспалительный экссудат. В ходе настоящего исследования также были выявлены: дермоидная киста, менинго-энцефало-цистоцеле носоглотки, киста Горнвальдта. 28 детям (96.5%) выполнена трансназальная или трансорозэпифарингеальная эндоскопическая марсупиализация и коагуляция кист с помощью электрохирургического комплекса. У всех пациентов результаты операции были удовлетворительными, послеоперационный период протекал без особенностей.

Таким образом, в большинстве случаев кисты бессимптомны, они могут быть причиной патологии полости носа. При обнаружении образования в носоглотке необходимо всестороннее обследование пациента, включая сбор анамнеза и клинической симптоматики, эндоскопию носоглотки. При отсутствии клинических проявлений в большинстве случаев достаточно динамического наблюдения за образованием, которое по данным эндоскопии, КТ или МРТ должно быть подробно описано: размер, местоположение, подвижность, цвет и наличие сосудистого компонента. Методом выбора в лечении носоглоточных кист является эндоназальное эндоскопическое хирургическое вмешательство.

СИСТЕМА АВТОМАТИЗАЦИИ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Попов С.А.¹, Горбачев А.Ю.^{1,3}, Федюшкина И.В.^{1,2}, Кулемин Н.А.^{1,2}

1 - Zenome.io LTD

2 - ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России, Лаборатория молекулярной генетики человека

3 - ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России, Лаборатория протеомного анализа

С помощью высокопроизводительного секвенирования в настоящее время решается значительное количество биологических и медицинских задач. Однако, в связи с высокой стоимостью оборудования, лабораториям, оказывающим услуги высокопроизводительного секвенирования и последующего анализа, приходится загружать, хранить и обрабатывать значительные массивы разнородных данных. На текущий момент вычислительная инфраструктура является важнейшим звеном в цепи получения научных результатов.

В рамках работы нами был разработан программно-аппаратный комплекс, включающий как непосредственно оборудование и алгоритмы его использования, так и программное обеспечение, которая позволяет с минимальным участием оператора обрабатывать типовые результаты исследований (полные геномы, панели), а также значительно упрощает работу исследователей при решении сложных научных задач. Впервые было применено и оптимизировано облачное атомарное хранилище данных для исходных результатов секвенирования с различными уровнями резервирования, построена структура управления данными на основе SQL и контейнеризации, внедрена система контроля качества и соответствия загружаемых данных исходным техническим заданиям.

Результатом применения разработанной системы стало значительное снижение нагрузки с научных сотрудников и повышение эффективности вычислительного оборудования при решении задач, связанных с анализом и интерпретацией данных секвенирования.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ МОДУЛЯТОРА СПЛАЙСИНГА ПЛАДИЕНОЛИДА-Б В КОМБИНАЦИИ С ЦИСПЛАТИНОМ НА МОДЕЛИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

Лукина М.М., Ануфриева К.С., Бойченко В.С., Иванова О.М., Шнайдер П.В., Арапиди Г.П., Шендер В.О.

Лаборатория молекулярной онкологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ Им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Основным недостатком современной противоопухолевой химиотерапии является формирование резистентности к используемым препаратам. В связи с этим, поиск новых мишеней и комбинаций препаратов является актуальной задачей в современной онкологии. Сплайсосомный аппарат может быть использован в качестве мишени для новых терапевтических агентов, поскольку сплайсинг мРНК представляет собой терапевтическую уязвимость для множества видов опухолей. Ранее нами было показано, что низкие дозы модулятора сплайсинга не вызывают гибели нормальных и опухолевых клеток, но значительно увеличивают чувствительность последних к цисплатину [Anufrieva K.S. et al./Genome Med, 2018]. Однако, механизм действия данной комбинации не был установлен. Таким образом, целью данной работы являлось исследование молекулярного механизма противоопухолевого действия пладиенолида-Б (Пл-Б) и цисплатина (ЦП) на клетках аденокарциномы яичника SKOV3. Схема эксперимента: клетки инкубировались 48 часов с низкой концентрацией Пл-Б (1,5 нМ), а затем со стандартной дозой IC50 ЦП (10 мкМ) от 6 до 48 часов в зависимости от эксперимента. По результатам МТТ теста и теста по оценке степени некроза и апоптоза было установлено, что предварительная инкубация клеток с Пл-Б повышает их чувствительность к ЦП и приводит к увеличению апоптоза по сравнению с клетками, обработанными только ЦП. В результате анализа протеомных профилей и транскриптома клеток было выявлено, что комбинация Пл-Б и ЦП нарушает сигнальные пути, важные для ответа опухолевых клеток на повреждение ДНК (репарация ДНК, регуляция клеточного цикла) по сравнению с клетками, обработанными только ЦП. По результатам иммунофлуоресцентного исследования на γ -H2AX было показано снижение интенсивности флуоресценции и фокусов при комбинации препаратов по сравнению с клетками, обработанными только ЦП, что может говорить о снижении способности клеток, обработанных комбинацией препаратов, к обнаружению повреждений ДНК и/или запуску реакций репарации. Таким образом, в результате исследования была установлена эффективность применения предварительной инкубации клеток SKOV3 с Пл-Б для увеличения чувствительности клеток к ЦП. Показано нарушение регуляции сигнальных путей ответа клетки на ДНК повреждение.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-15-00462 (за LC-MS/MS анализ) и грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ (за RNAseq).

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНА IL-17 И СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЗГА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Малашенкова И.К., Ушаков В.Л., Крынский С.А., Огурцов Д.П., Захарова Н.В., Хайлов Н.А., Чекулаева Е.И., Дидковский Н.А.
Лаборатория клинической иммунологии

Шизофрения (ШЗ) - хроническое психическое расстройство, вызываемое сложной палитрой генетических, эпигенетических и повреждающих факторов окружающей среды. В последние годы показана важная роль иммунных нарушений и нейровоспаления в патогенезе различных форм ШЗ.

Стало очевидно, что у больных ШЗ есть структурные изменения мозга по данным МРТ, но механизмы, лежащие в их основе, еще полностью не ясны. При этом их степень у больных может заметно отличаться. До настоящего времени нет общепринятых подходов к использованию данных нейровизуализации для постановки диагноза ШЗ, прогнозирования, подбора терапии и ее мониторинга. Один из важных путей к трансляции данных МРТ в клиническую практику - изучение взаимосвязей между структурными нарушениями мозга и уровнем ассоциированных с клинической картиной иммуновоспалительных маркеров при ШЗ.

IL-17A –провоспалительный цитокин, продуцируемый лимфоцитами Т-хелперами 17, активирует транскрипционный фактор NF-κB и митоген-активируемые протеинкиназы, вызывая экспрессию медиаторов системного воспаления. В отдельных работах изучается роль IL-17A в патогенезе ШЗ. Анализ литературы показывает, что практически не изучено возможное значение IL-17A в поражении мозга при ШЗ.

Цель работы - изучение взаимосвязей между уровнем IL-17A и параметрами структурной нейровизуализации для оценки возможной его роли в поражении мозга при ШЗ.

В исследование вошли 60 больных ШЗ (29 муж., 31 жен., ср. возраст – 29,14±1,83 лет). 85 добровольцев без когнитивных нарушений (31 муж., 54 жен., ср. возраст - 27,5±4,2 г.), сопоставимых с больными по полу и возрасту. Уровень IL-17A определяли методом ELISA. МРТ-исследование проводилось с использованием прибора Magnetom Verio 3T (Siemens, Germany), данные получали на основе T1-взвешенных изображений.

Уровень IL-17A в среднем у больных ШЗ был повышен ($p < 0,05$). Анализ взаимосвязи уровня IL-17A в крови с результатами структурной визуализации выявил следующие результаты. У больных с уровнем IL-17A > 5 пг/мл был достоверно снижен по сравнению с контролем показатель средней толщины в зонах левого полушария: в области левой латеральной орбитофронтальной извилины ($p=0,002$), орбитальной части левой нижней лобной извилины (ЛНЛИ) ($p=0,00008$), треугольной части ЛНЛИ ($p=0,006$), роstralной части левой средней лобной извилины ($p=0,002$), левой верхней лобной извилины ($p=0,0007$). Кроме того, у данных пациентов имело место достоверное снижение средней толщины в следующих зонах правого полушария: нижней височной извилине ($p=0,001$), латеральной орбитофронтальной извилине ($p=0,003$), покрышечной части правой нижней лобной извилины (ПНЛИ) ($p=0,001$), орбитальной части ПНЛИ ($p=0,005$), треугольной части ПНЛИ ($p=0,0006$), роstralной части правой средней лобной извилины ($p=0,004$), правой верхней лобной извилины ($p=0,00003$). Ряд указанных зон принимают участие в речевых функциях и регуляции влечений.

С учетом показанных нами взаимосвязей уровня IL-17A с клиническими симптомами ШЗ и рядом иммунных нарушений, а также известной роли этого цитокина в хроническом воспалении, полученные данные указывают на возможную роль IL-17 в нейровоспалении и изменении отдельных зон мозга при шизофрении.

ЦИТОРЕДУКТИВНЫЕ ОПЕРАЦИИ У БОЛЬНЫХ С ДИССЕМИНИРОВАННЫМИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ НА ФОНЕ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ ИМАТИНИБОМ

Мещеряков А.А., Филоненко Д.А.

Институт инновационной медицины ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России

ФНКЦ им. А.С.Логинова

Обзор. Целесообразность выполнения циторедуктивных операций на фоне эффективной лекарственной терапии иматинибом у больных с диссеминированными гастроинтестинальными стромальными опухолями (ГИСО) не доказана. Для изучения роли циторедуктивных операций проведено ретроспективное сравнение двух когорт больных с диссеминированными ГИСО: когорты 1 – комбинированное лечение (КЛ), включающее иматиниб и хирургическое лечение, когорты 2 – только лекарственная терапия иматинибом как стандарт лечения данной группы больных (ИМ).

Материалы и методы. В исследование включено 44 больных, получавшие иматиниб в качестве первой линии терапии. Для сравнения прогностически близких групп в исследование включались только больные с поражением брюшины и/или печени, у которых отмечался противоопухолевый эффект на иматиниб, в том числе для контрольной группы в течение не менее 12 месяцев. В группе КЛ больным проводилось лечение иматинибом с последующим удалением всех метастазов, когда они становились резектабельными. В группе ИМ – лечение иматинибом до прогрессирования болезни.

Результаты. Характеристики больных были схожими в обеих группах. В группе КЛ было больше больных с частичной регрессией (86% против 56%, $p=0,165$), в группе ИМ было больше больных с метастазами по брюшине (45% против 27%, $p = 0,759$). Медиана времени до циторедуктивных операций составила 8 месяцев. Время без прогрессирования и общая выживаемость были существенно больше в КЛ группе по сравнению с группой ИМ: медиана времени без прогрессирования составила 78 против 35 месяцев ($p=0,08$); медиана общей выживаемости – 141 против 80 месяцев ($p=0,154$).

Выводы. Циторедуктивные операции улучшают результаты лечения больных гастроинтестинальными стромальными опухолями на фоне эффективной терапии первой линии иматинибом. Комбинированное лечение позволило увеличить общую выживаемость с 12 -18 месяцев до 141 месяца.

ВОСПРОИЗВОДИМЫЕ МИКРОБНЫЕ БИОМАРКЕРЫ КИШЕЧНИКА СВЯЗАННЫЕ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ОТВЕТОМ НА ИММУНОТЕРАПИЮ

¹Олехнович Е.И., ^{1,2}Иванов А.Б., ³Бабкина А.А., ³Соколов А.А.,

²Ульянцев В.И., ¹Федоров Д.Е., ¹Ильина Е.Н.

Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии

¹ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Российская федерация;

²Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Российская федерация;

³Московский физико-технический институт, Российская федерация;

Микробиом кишечника человека играет важную роль как для здоровья, так и для болезней человека. Недавние исследования продемонстрировали явное влияние состава микробиоты кишечника на эффективность иммунотерапии рака. Однако, исследователям пока не удалось найти надежные прогностические метагеномные маркеры, связанные с ответом на иммунотерапию которые бы имели потенциал для применения в клинической практике. Таким образом, повторный анализ опубликованных данных может улучшить понимание связи между составом микробиоты кишечника и реакцией на лечение. В данном исследовании мы сосредоточились на метагеномных данных полученных от пациентов больных меланомой, проходивших иммунотерапию, поскольку для данного типа злокачественной опухоли проведено достаточное количество исследований по сравнению с другими типами. Мы проанализировали 680 метагеномов образцов стула из семи опубликованных ранее исследований. Таксономические и функциональные биомаркеры были отобраны по результатам сравнения метагеномов пациентов с разной реакцией на лечение. Согласно результатам нашего анализа, полученные в результате перекрестного исследования, таксономические биомаркеры, связанные с положительным ответом на иммунотерапию, включали три бактериальных вида: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis* и *Eubacterium rectale*. 101 группа генов были идентифицированы как функциональные биомаркеры позитивного исхода лечения, которые включали в себя и потенциально участвующие в производстве иммуностимулирующих молекул и метаболитов. Кроме того, мы ранжировали микробные виды по количеству генов, кодирующих функционально значимые биомаркеры, содержащиеся в них, таким образом составляя список потенциально «наиболее полезных» бактерий для успеха иммунотерапии. *F. prausnitzii*, *E. rectale* и три вида бифидобактерий (*B. adolescentis*, *B. longum* и *B. bifidum*) выделялись как наиболее полезные виды, хотя некоторые полезные функции также присутствовали у других видов бактерий. Полученные нами результаты могут быть использованы для разработки рекомендаций по коррекции микробиоты кишечника при иммунотерапии рака, а также в качестве хорошей отправной точкой для разработки диагностического теста, направленного на прогнозирование реакции пациентов на иммунотерапию меланомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-75-10029 (<https://rscf.ru/project/22-75-10029/>).

МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Пикина А. С., Ручко Е. С., Богомякова М. Е., Лагарькова М. А., Еремеев А. В.

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Центральная нервная система (ЦНС) является одним из самых труднодоступных объектов для доставки фармакологических средств из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), ключевой структуры, которая ограничивает транспорт молекул из кровотока в головной мозг и обеспечивает гомеостаз в ЦНС. Неэффективность транспорта препаратов через ГЭБ может быть вызвана различными причинами, например, особенностями физико-химических свойств транспортируемых молекул или структурно-функциональными патологическими изменениями. Из-за неэффективности транспорта через ГЭБ терапия некоторых нейродегенеративных заболеваний затруднена, и эта проблема требует новых подходов для решения. Для изучения и тестирования терапевтических агентов необходимо создание простых и воспроизводимых моделей ГЭБ, в которых *in vitro* были бы воссозданы основные свойства и функции нативного барьера. Такие модели *in vitro* также могут служить изучения влияния нейродегенеративных заболеваний на целостность ГЭБ.

В данной работе мы получали модель ГЭБ в системе 3D-сфероидов, а также в планшетах Transwell™. В качестве исходного клеточного материала мы использовали клетки пуповинной вены человека (HUVES) и нейроэпителиальные клетки-предшественники (NPC), полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с помощью направленной дифференцировки в нейральном направлении. Васкуляризированные нейральные органоиды получали в планшетах AggreWell™ и культивировали в мини-биореакторах на орбитальном шейкере. Модели ГЭБ в Transwell™ получали наслаиванием NPC и HUVES на мембраны внутренних лунок планшета. Для характеристики полученных моделей использовали метод иммуноцитохимического окрашивания нейрального белка β 3-тубулина, глиального белка GFAP, белков плотных контактов окклюдина, клаудина и zonula-occludens 1 (ZO-1), а также поверхностных белков эндотелия CD31 и CD105. На моделях Transwell™ мы измерили трансмембранное сопротивление методом TEER и провели тестирование на проницаемость с помощью декстрана, меченного FITC.

В результате мы показали, что нейроэпителиальные клетки, сокультивируемые с HUVES в 3D-сфероидах или в планшетах Transwell™, корректно формируют модель ГЭБ *in vitro*, которая отвечает основным характеристикам ГЭБ *in vivo*. Полученные варианты модели ГЭБ могут быть использованы для изучения нейродегенеративных заболеваний и тестирования транспорта различных препаратов.

ВИРУЛЕНТНЫЕ СВОЙСТВА АДГЕЗИВНО-ИНВАЗИВНОЙ *ESCHERICHIA COLI*, ПОЛУЧЕННОЙ ОТ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА, СВЯЗАНЫ С ПЕРЕСТРОЙКОЙ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Побегуц О.В., Галямина М.А., Михальчик Е.В., Ковальчук С.И., Смирнов И.П., Ли А.В.,
Ракитина Д.В., Горбачев А.Ю.

Лаборатория протеомного анализа

В последние 15 лет особое внимание исследователей привлекает группа патобионтов, названных адгезивно-инвазивными *Escherichia coli* (АИЕС), которые развили способность прикрепляться и проникать внутрь эпителиальных клеток, выживать и размножаться внутри макрофагов, а также провоцировать воспалительный процесс, активируя секрецию провоспалительных цитокинов. Особую популярность среди исследователей АИЕС получили в связи с тем, что они рассматриваются в качестве одной из возможных причин развития болезни Крона (БК). Предполагается, что они могут провоцировать начало воспалительного процесса и стимулировать хроническое воспаление и развитие гранулемы. Нами обнаружено, что вирулентные свойства изолятов *E. coli*, полученных от пациентов с БК (АИЕС) зависят от источника углерода: пассирование на минимальной среде М9 с добавлением пропионата натрия (ПА) приводит к значительному увеличению, а пассирование на среде М9 с добавлением глюкозы, наоборот, к значительному снижению адгезивно-инвазивных свойств и способности выживать в макрофагах. Эффект ПА был обратимым. Мы получили возможность сравнить изогенные штаммы в двух состояниях: вирулентном (аАИЕС) и невирулентном (нАИЕС), что позволило определять факторы, связанные с вирулентным фенотипом. В отличие от АИЕС, ПА не вызывал подобного эффекта в случае лабораторного штамма K12 Mg1655 и изолятов *E. coli* от здоровых людей. Показано, что аАИЕС активирует НАДН-оксидазу нейтрофилов и продукцию провоспалительных цитокинов в отличие от нАИЕС и K12 Mg1655, пассированного на среде с ПА. Анализ мембранных фракций аАИЕС и нАИЕС в этих двух состояниях методами дифференциального 2Д-электрофореза и ВЭЖХ-МС показал, что пассирование АИЕС на минимальной среде с ПА приводит к значительной перестройке представленности мембранных белков. Мы идентифицировали мембранные белки, которые могут быть связаны с активацией вирулентных свойств АИЕС, и в частности, с активацией НАДН-оксидазы нейтрофилов и увеличением продукции провоспалительных цитокинов. Наиболее значимые из них – изоформы порина OmpA. Известно, что OmpA является «мажорным» белком в составе мембраны *E. coli* и, помимо своей основной функции, играет роль в процессе адгезии и инвазии АИЕС в клетки эпителия, блокирует активацию комплемента посредством связывания с С4-белком, участвует в индукции антиапоптотического фактора *Bclxl* при взаимодействии АИЕС с макрофагами, является мишенью для эластазы нейтрофилов и т.д. Мы определили, что активация вирулентных свойств АИЕС при росте в минимальной среде с ПА связана с образованием определенных изоформ белка OmpA, а также с аминокислотными заменами в вариабельных внешних петлях этого белка. Мы предполагаем, что формирование изоформ связано с посттрансляционными модификациями (ПТМ). Определены сайты фосфорилирования и пропионирования белка OmpA. Предполагается, что фосфорилирование осуществляет сериновая протеинкиназа YeaG, субстраты которой пока еще плохо изучены. Источником для пропионирования остатков лизина OmpA является пропионил-КоА, который образуется в результате метаболизма пропионата в метилцитратном цикле.

РОЛЬ ДИАГНОСТИКИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В УРОЛОГИИ

Пронкин Е.А., Степанова Е.В., Беспярых Ю.А.

Отделение урологии, центр молекулярной медицины и диагностики

Проблема повсеместного распространения микроорганизмов устойчивых к лекарственным препаратам, на сегодняшний день стоит достаточно остро во всем мире. В тоже время, зачастую в практике врачей-урологов данной проблеме уделяется недостаточно внимания. Однако, исследование Global Prevalence of Infection in Urology Study показало, что у 10-12% больных в урологических отделениях развивается внутрибольничная инфекция. Отмечается рост резистентности на 10% всех уропатогенов к антибиотикам, кроме карбапенемов, во всех регионах. Независимо от типа инфекции антибиотикотерапия в большинстве случаев назначается эмпирическим путем в первые дни обращения пациента, до результатов микробиологического посева мочи. Внедрение в клиническую практику молекулярно-генетических тестов, таких как выявление генов резистентности методом полимеразной цепной реакции позволит своевременно назначать корректную схему лечения. В докладе представлены результаты и опыт применения коммерческих наборов фирмы НПФ «Литех» (Россия) для выявления генов резистентности в моче методом ПЦР в рутинной практике отделения урологии клинической больницы ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ РЕОРГАНИЗАЦИЕЙ ЦИТОСКЕЛЕТА В ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИПСК С НОКАУТОМ ГЕНА *UBE2A*

Секретова Е. К., Хомякова Е. А., Федоренко А. В., Лаврушкина С. В., Лагарькова М. А., Богомазова А. Н., Алиева И. Б.

Лаборатория клеточной биологии

В 2006 году был описан новый X-сцепленный синдром умственной отсталости, или синдром Насименто, характеризующийся пороками развития мозга, тяжелой умственной отсталостью, задержкой речевого развития, а также нарушением развития кожи и ее производных. Синдром Насименто вызван мутациями в гене *UBE2A*, приводящими к потере функции фермента Ube2a. Данный белок является участником системы убиквитинирования и относится к ферментам категории E2, он опосредует реакцию переноса убиквитина с фермента E1 на таргетный белок с участием убиквитин-лигаз. На данный момент функции белка Ube2a в клетке изучены плохо, особенно в контексте развития синдрома Насименто. В то же время известно, что патологии развития мозга зачастую связаны с нарушениями внутриклеточных процессов, в которых участвуют компоненты цитоскелета. Таким образом, целью нашей работы было изучение морфологических и функциональных особенностей цитоскелета клеток при нокауте гена *UBE2A*.

В работе использовали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) с нокаутом гена *UBE2A*, полученные ранее в нашей лаборатории. Линию дикого типа IPSRG4S и три соответствующих линии с нокаутом *UBE2A* дифференцировали в фибробластоподобные производные. Полученные фибробластоподобные клетки экспрессировали специфичные маркеры фибробластов: CD73, CD105, CD90, при этом нокаут *UBE2A* не оказывал влияния на эффективность дифференцировки. В серии прижизненных экспериментов мы показали, что все три линии фибробластоподобных производных с нокаутом гена *UBE2A* характеризуются ускоренной динамикой распластывания клеток на субстрате по сравнению с контролем. Так, фибробластоподобные производные с нокаутом *UBE2A* достигали максимальной площади и периметра за 2 часа, в то время как контрольные клетки достигали тех же параметров за 7,5 часов от начала прикрепления. Нокаут *UBE2A* влиял и на скорость поляризации фибробластоподобных производных: циркулярность клеток дикого типа через два часа после распластывания была в 1,33 выше по сравнению с нокаутными линиями ($p < 0.0001$). Мы оценили распределение фокальных контактов в ламелле распластывающихся клеток и показали, что в линии с нокаутом гена *UBE2A* заметно увеличивалась средняя площадь фокальных контактов ($2,94 \pm 0,06$ мкм², N=481), по сравнению с контролем ($2,09 \pm 0,05$ мкм², N=151), а также суммарное количество фокальных контактов почти в 5 раз превышало норму ($p < 0.0001$). Изменялась и архитектура актиновой сети на ранних стадиях распластывания клеток. В то время как линии дикого типа содержали плотные пучки актина, тянущиеся от края к центру клетки, в цитоплазме клеток с нокаутом гена *UBE2A* актиновые филаменты формировали диффузно распределенную сеть.

Как известно, белки, связанные с актином, а также Rho ГТФазы, регулирующие динамику актина, опосредует развитие множества форм умственной отсталости [2]. Наши данные косвенно свидетельствуют об участии фермента Ube2a в регуляции динамики актина, что может лежать в основе патогенеза синдрома Насименто.

ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ TGF- В РЕЦЕПТОРА

Силантьев А.С.¹, Воловецкий А.Б.², Трушина Д.Б.², Сапач А.Ю.², Капитанникова А.Ю.², Носырев А.Е.², Звягин А.В.²

¹ Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

² Институт молекулярной тераностики, Научно-технологический парк биомедицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)
artsilan@gmail.com +7 965-403-24-55

Введение. Рак мочевого пузыря (РМП) составляет 4.2% от всех случаев регистрируемых онкологических заболеваний. Даже случаи мышечно-неинвазивного РМП отличаются высокой степенью злокачественности и имеют высокий риск рецидива, что требует постоянного наблюдения за пациентом и проведения повторяющихся курсов терапии. На сегодняшний день большинство терапевтических подходов для лечения РМП основаны на применении высокотоксических платина-содержащих препаратов или хирургической резекции опухоли. Ингибиторы рецептора трансформационного фактора роста А8301 и А7701 являются перспективными агентами для терапии рака мочевого пузыря. Настоящая работа посвящена использованию метода масс-спектрометрии для проведения доклинических исследований перспективных ингибиторов TGF- β рецептора.

Материалы и методы. Доклинические исследования перспективных ингибиторов TGF- β рецептора были проведены на экспериментальных животных моделях. Была проведена оценка фармакокинетики и фармакодинамики исследуемых веществ для различных условий, а также форм введения. Оценка концентрации исследуемых веществ в органах и тканях проводилась методом УВЭЖХ-ТОФМС/МС с использованием SCIEX 6600QTOF, совмещенного с хроматографом Exion LC AD.

Результаты. Была установлена нестабильность А8301 для протонных растворителей и его быстрая деградация до А7701. Концентрация А7701 в плазме модельных животных пропорциональна концентрации А8301 и связана с его образованием из А8301. Пик концентрации для А8301 в тканях мочевого пузыря при пероральном введении наступает течение 0,5–3 часов после приема внутрь, однако процент от введенной дозы для А8301 в тканях мочевого пузыря составляет порядка ~0,1% от принимаемой пероральной дозы. Местное введение А8301 в составе биодegradуемого двухкомпонентного альгинатного геля позволяет добиться повышения концентрации терапевтического агента в органе-мишени более чем в 1000 раз по сравнению с пероральным введением эквивалентной дозы. Кроме того, такой путь доставки препарата позволяет достичь концентрации А8301 на уровне 1–10 мкг на мг ткани мочевого пузыря не менее чем в течение 2 недель. Для А8301 и А7701 была произведена оценка системного и тканевого метаболизма, и установлено образование гидроксированного производного для А8301 и продукта его последующей конъюгации с глюкуроновой кислотой; для А7701 уникальных метаболитов не выявлено.

Выводы. Применение метода масс-спектрометрии позволило быстро и эффективно оценить фармакокинетические и фармакодинамические свойства исследуемого препарата, установить пути его метаболизма и оценить эффективность применения локальных форм доставки.

Работа финансируется из средств гранта Правительства Российской Федерации: № 075-15-2019-1927

ПОИСК ЭНХАНСЕРНЫХ РНК, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С АНДРОГЕНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ И АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Султанов Р.И., Суздаленко А.С., Арапиди Г.П.

Лаборатория системной биологии

Энхансерные РНК (эРНК) - это длинные некодирующие РНК, экспрессирующиеся с активных энхансеров. Несмотря на долгую историю изучения феномена роль и функции эРНК точно неизвестны. Было показано, что некоторые эРНК вовлечены в регуляцию элонгации транскрипции. Известны примеры того, что эРНК помогают формировать трехмерную структуру хроматина, связываясь с транскрипционными факторами и когезином. Кроме того, эРНК могут регулировать экспрессию генов направляя белки группы поликомб (SUZ12, EZH2) на промоторы. Известно, что андрогеновый рецептор (АР) активирует экспрессию эРНК, которые вовлечены в онкогенез рака предстательной железы. Однако несмотря на наличие РНК-связывающего домена у АР, вопрос о непосредственном взаимодействии АР и эРНК так и не был решен.

В этой работе мы проанализировали открытые данные секвенирования РНК клеточной линии РПЖ LNCaP и обнаружили 1820 новых транскриптов, экспрессирующихся с энхансерных регионов. Из них 24 значимо представлены в данных иммунопреципитации РНК с антителами специфичными к АР в клеточной линии LNCaP (АРА-эРНК). В дальнейшем исследовании мы решили оставить только те АРА-эРНК, которые содержат известный РНК-мотив связывания с АР, и, кроме того, экспрессируются только в клеточных линиях РПЖ по данным Cancer Cell Line Encyclopedia. Кроме того, мы не брали в анализ те АРА-эРНК, которые лежат рядом сайтами связывания АР в геноме. Только 2 АРА-эРНК удовлетворяют этим критериям (gene.81834.17 и gene.56338.3). Анализ данных ChIA-PET на РoIII клеточной линии LNCaP показал, что энхансер gene.81834.17 АРА-эРНК, возможно, вовлечен в регуляцию экспрессии генов CCDC57 и TEX19. Так как для андрогенового рецептора известны примеры регуляции экспрессии генов с участием длинных некодирующих РНК, мы предположили, что АРА-эРНК могут регулировать активность андроген-зависимых генов *in trans*. Для того чтобы проверить эту гипотезу, мы воспользовались данными РНК-секвенирования проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA) для РПЖ и определили гены, уровень экспрессии которых наиболее скоррелирован с экспрессией АРА-эРНК. Экспрессия энхансера gene.56338.3 значимо коррелирует с пониженной экспрессией генов-маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП: VIM, IL32, NNMT). Кроме того, экспрессия этого энхансера значимо ассоциирована ($fdg=0.01$) с плохим прогнозом исхода заболевания по данным TCGA. Интересно что гены, ассоциированные с энхансером gene.56338.3, повышают экспрессию при нокадауне гена EZH2, следовательно регуляция экспрессии генов маркеров ЭМП в РПЖ может осуществляться через белки группы поликомб. При помощи эксперимента по электрофоретической задержки в геле мы подтвердили, что эРНК gene.56338.3 действительно взаимодействует с АР.

Подводя итоги, в этом исследовании мы показали, что существуют энхансерные РНК, которые не находятся под непосредственной регуляцией АР, но при этом физически с ним связываются и потенциально могут регулировать экспрессию других генов, вовлеченных в ЭМП. Мы предложили, что регуляция экспрессии этих генов может осуществляться за счет привлечения белков группы поликомб. Эти данные в дальнейшем позволят лучше понять роль эРНК в регуляции экспрессии.

Работа поддержана Грантом РФФ 22-75-00129

ЛЕВАМИЗОЛ-ИНДУЦИРОВАННАЯ ЛЕЙКОЭНЦЕФАЛОПАТИЯ

Хомутов В.Е., Колесникова И.В., Беспярых Ю.А.

Отделение неврологии, Центр молекулярной медицины и диагностики

Левамизол, применяемый для лечения гельминтных инфекций и в онкологической практике, является тимопоэтином, способным оказывать индуцирующее влияние на Т-лимфоциты и формировать развитие усиленного В-клеточного ответа. При этом, побочные эффекты данного антигельминтного и иммуномодулирующего препарата начали описывать еще в 90-х годах прошлого века. Одним из наиболее тяжелых и редких побочных эффектов является левамизол-индуцированная лейкоэнцефалопатия, проявляющаяся многообразием клинических вариантов, от изменения уровня сознания до парезов и грубых координаторных расстройств. Проявление интереса к данной теме обусловлено незначительной представленностью описанных в литературе случаев данной нозологии.

Пациентка Ф. 27 лет поступила в стационар 26.04.2022 с жалобами на выраженную общую слабость, тошноту, рвотные позывы, слабость в левых конечностях. При выполнении МРТ головного мозга были выявлены признаки множественных очагов в полушариях большого мозга, вероятно, демиелинизирующего характера, заподозрен ОРЭМ. Проведена люмбальная пункция, по результатам которой было выявлено: глюкоза 2.59 ммоль/л, лимфоциты 19%, белок 0.2 г/л, выраженный цитоз. При уточнении анамнестических сведений выяснено, что за несколько недель до госпитализации пациентка осуществила прием левамизола без назначения врача. Выдвинуто предположение о развитии левамизол-индуцированной лейкоэнцефалопатии. Проведен расширенный блок лабораторной диагностики, включая качественное определение уровня антинейтрофильных антител к МРО, PR3, антител к GBM, проведен скрининг уровня антител к ядерным антигенам. Начат курс лечения, включая в/в введение метилпреднизолона 1000 мг 1 р/д, на фоне чего отмечена стремительная редукция неврологического дефицита. После выписки пациентка продолжает находиться под интенсивным динамическим наблюдением. По результатам МРТ головного мозга в динамике, выполненной через несколько месяцев, отмечена умеренно выраженная положительная тенденция.

В России для профилактики гельминтных инфекций распространено использование левамизола без рекомендации врача, а иногда и на ее основании, несмотря на то, что Всемирная организация здравоохранения подобную профилактику не рекомендует, а сам препарат действует только против ограниченного спектра гельминтозов. Представленный клинический случай доказывает, что в некоторых случаях бесконтрольный прием данного препарата способен стать причиной тяжелых неврологических осложнений. Своевременная правильная диагностика и лечение способны оказать благоприятное влияние на здоровье пациента и в значительной степени улучшить дальнейший прогноз.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОЗМОЖНОГО ПОЛИМОРФИЗМА КВАДРУПЛЕКСНЫХ И I-МОТИВНЫХ ФОРМ ПРИ КОНТАКТАХ ДНК

Цветков В.Б.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Известно, что содержащие G-повторы участки ДНК и РНК могут формировать квадруплексы, а содержащие C-повторы, - i-мотивы. Топология таких неканонических форм изучена достаточно подробно. Была показана возможность образования тетрамеров посредством формирования квадруплесов одноцепочечными ДНК и РНК, несущими G-повторы. При этом вопрос о том, возможно ли формирование таких форм при контактах дуплексов ДНК и РНК, до последнего времени оставался открытым. Ранее были описаны данные, позволяющие предположить наличие таких форм. Представленные в опубликованных статьях изображения АСМ позволили зарегистрировать факт контакта дуплексов, имеющих такие повторы и подплавленных в области их локализации. Однако в силу недостаточного разрешения АСМ-снимки не позволяют дать ответ на вопрос, каким образом происходит возникновение неканонических форм. В данном исследовании предложена стратегия создания 3D моделей неканонических форм ДНК и РНК. Посредством этой стратегии были построены и протестированы с использованием МД модели всех возможных форм квадруплексов и i-мотивов, обусловленных контактами как между одноцепочечными ДНК, так и между дуплексами, имеющими в своей структуре $(G_3T)_nG_3$ фрагменты. Используя эту стратегию, были изучены как возможные варианты самих квадруплексов и i-мотивов при контакте дуплексов, так и возможные вариации их локализации друг относительно друга. Проведённое исследование продемонстрировало существенно большее число вариантов возможных контактов посредством неканонических форм, чем было предложено ранее на основании схематического подхода. Топология этих форм оказалась довольно сложной и разнообразной. В частности, были построены модели стопок, сформированных из право- и левозакрученных квадруплексов; структуры, напоминающей структуру Холидея, с дыркой, на границе которой расположены друг напротив друга квадруплекс и i-мотив; слоёв, сформированных из квадруплексных сеток. Посредством оценки вкладов в свободную энергию были определены наиболее вероятные из неканонических форм, возникающих при контактах вышеупомянутых дуплексов для $n=1,3,5$. Возможно, обнаруженные в этом исследовании структуры помогут прояснить остающиеся до сих пор неясными моменты в процессах репликации, рекомбинации и репарации.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Ширшиков Ф. В., Беспятых Ю. А.
Лаборатория молекулярной медицины

Глобальная нагрузка на системы здравоохранения разных стран, вызванная коронавирусной инфекцией COVID-19, привела к повышению смертности от туберкулёза (ТБ). По самым последним данным, приводимым в ежегодном отчёте Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2022 г., ТБ стал причиной смерти примерно 1.6 миллионов человек в 2021 г., среди которых было 187 тысяч ВИЧ-инфицированных пациентов; в 2020 г. зарегистрировано до 1.5 миллионов смертей от ТБ; а в 2019 г. этот показатель был на уровне 1.4 миллионов случаев. Таким образом, констатируется, что к настоящему времени смертность от ТБ вернулась к показателям 2017 г. Российская Федерация при этом входит в число десяти лидирующих стран, на долю которых приходится более 90% общего сокращения числа случаев впервые диагностированного ТБ в 2020–2021 гг. по сравнению с 2019 г. Дальнейшее сокращение заболеваемости и, как следствие, смертности от ТБ во многом зависит от эффективности мер, направленных на повышение доступности и качества диагностических процедур.

Несмотря на ценность культуральных методов диагностики ТБ, для ускоренной идентификации микобактерий часто востребован ряд молекулярно-генетических методов, позволяющих идентифицировать возбудителя в течение одного дня. Такие методы могут значительно улучшить эпидемиологическую обстановку по ТБ в конкретном населенном пункте и замедлить рост заболеваемости в мире.

Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP; от англ. *loop-mediated isothermal amplification*), разработанный японскими исследователями из компании Eiken Chemical Co. LTD (Токио, Япония), практически сразу же был использован в качестве платформы для быстрой идентификации возбудителя ТБ. На сегодняшний день единственной тест-системой для быстрой идентификации *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ) на основе метода LAMP, рекомендованной ВОЗ для использования в диагностике ТБ, является тест-система компании Eiken Chemical Co. LTD. Для данного качественного теста с детекцией по конечной точке заявлена высокая аналитическая чувствительность, позволяющая определять единичное количество клеток, а время амплификации составляет 40 мин. В качестве мишени тест-система использует консервативный ген *gyrB*.

Целью настоящего исследования стала разработка новой тест-системы для количественной идентификации *M. tuberculosis* на основе метода LAMP, позволяющей проводить детекцию амплификации в режиме реального времени.

Решались задачи по поиску подходящей мишени в геноме МТБ, соответствующей критериям однокопийности и видоспецифичности, дизайну праймеров и их экспериментальному тестированию, а также по оптимизации условий проведения амплификации и состава реакционной смеси.

В результате работы разработан способ идентификации геномной ДНК МТБ методом LAMP на основе амплификации участка видоспецифичного и однокопийного гена *lppQ*, позволяющий в режиме реального времени определять до 40 геном-эквивалентов на реакцию за 15 мин. По совокупности представленных характеристик данный способ диагностики не имеет аналогов в мире и может стать новым эффективным инструментом для эпидемиологического мониторинга ТБ с целью дальнейшего снижения новых случаев инфицирования МТБ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда № 20-75-10144.

УНИФИЦИРОВАННАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО КОМПЛЕКСА: ОТ ФИЛОГЕНОМИКИ К КЛИНИКЕ

Шитиков Е., Беспярых Д., Зайчикова М., Меркер М., Мокроусов И.
Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

Микобактерии туберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis* complex, МТВС) – группа тесно взаимосвязанных видов и подвидов кислотоустойчивых бактерий, способных вызывать туберкулез (ТБ). Согласно анализу геномных данных, однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) и делеции в так называемых регионах различий (RDs) считаются наиболее надежными маркерами для филогенетического анализа и дифференциации изолятов МТВС. Целью настоящего исследования было предложить унифицированную классификацию МТВС на уровне SNPs и RDs с последующим рассмотрением эндемичного кластера *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148.

В исследование были включены данные полногеномного секвенирования более 10000 образцов МТВС из баз данных NCBI и ENA (58 различных исследований). Данные полногеномного секвенирования были обработаны с использованием программного пакета Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>). Геномы *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) и *M. canettii* (NC_015848.1) были использованы в качестве референсных. Контроль качества покрытия проводили с помощью QualiMap (v.2.2.2). Минимальное среднее покрытие для геномов было выбрано на уровне 50; количество чтений, выравниваемых на референсный геном, – не менее 90%. Филогенетические деревья строили с использованием RAxML-NG (v.1.0.1) (GTR+G модель). Видовую дифференциацию образцов внутри МТВС устанавливали с помощью утилиты snpit (v.1.0.0). Унифицированную классификацию по SNPs и список всех возможных RDs составляли на основе 12 и 24 независимых исследований соответственно.

В ходе обобщения литературных данных и анализа результатов полногеномного секвенирования была предложена унифицированная классификация *M. tuberculosis* филогенетических линий L1-L9, а также полиморфизмы для идентификации представителей *M. caprae*, *M. bovis*, *M. orygis*, *M. microti* и *M. pinipedii*. Классификация подразумевает иерархическое деление на пять филогенетических уровней и включает анализ по 213 полиморфизмам в автоматическом режиме. Для достоверности типирования начальные уровни содержат по два баркода, а общий анализ и вывод идет по всем филогенетическим уровням, что реализовано впервые.

Для поиска RDs из каждой филогенетической единицы было отобрано по 10 (максимальное количество, если геномов меньше) образцов. В результате в наборе данных из 721 образца было обнаружено 14471 делеция. Среднее количество делеций на геном составило 20, с наибольшей частотой у видов, адаптированных к животным (31Δ на образец). Наибольшая средняя длина делеции на образец была обнаружена в образцах L6 *M. tuberculosis* (3209 п.н. на образец). Сравнение делеций со списком всех ранее описанных RD (n=170) показало специфичность 79 RD на уровне вида, линии или подлинии, 17 из которых были описаны впервые, а также высокую сходимость с результатами SNP анализа. Для обнаружения делеций у видов МТВС была разработана утилита RDscan (<https://github.com/dbespiatykh/RDscan>).

Разработанные подходы были использованы для поиска и описания представителей кластера Beijing B0/W148 (L2.2.M4.5) филогенетической линии L2. На 720 образцах из 23 стран биоинформатическими методами было показано, что кластер образовался в 1963 году и претерпел две волны экспансии в конце 80х и 90х годов, что соответствует социально-экономическим изменениям в стране. Также было установлено, что широкому распространению способствовало накопление компенсаторных мутаций в геноме патогена.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 20-04-00686.

ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ НА PAPP-A-СПЕЦИФИЧНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ IGFBP-4 В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ

Адашева Д. А.¹, Базовкина М. А.¹, Лебедева О. С.^{2,3}, Голиусова Д.В.^{2,3}, Постников А.Б.⁴,
Лагарькова М. А.^{2,3}, Серебряная Д. В.¹

¹Группа адаптивных клеточных механизмов, Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, ²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия, ³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия, ⁴HuTest, Турку, Финляндия.

На сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания являются главной причиной смертности среди населения развитых стран. Одним из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний является сердечная недостаточность (СН). Ключевую роль в развитии СН играют такие патологические состояния, как гипертрофические изменения миокарда и хроническое воспаление. Одними из прогностических маркеров, появление в кровотоке которых свидетельствует о развитии СН, являются протеолитические фрагменты белка IGFBP-4 (insulin-like growth factor binding protein-4) - NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, которые образуются в результате его специфического протеолиза под действием PAPP-A (pregnancy associated plasma protein A). PAPP-A является единственной протеазой, расщепляющей IGFBP-4 в физиологических условиях по специфическому сайту. Механизмы увеличения уровня протеолиза IGFBP-4 при СН остаются неизученными, и их исследование представляет собой задачу, актуальную как с фундаментальной научной, так и с прикладной биомедицинской точек зрения. На сегодняшний день остается неизвестным, происходит ли усиление специфического протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A при воспалительных реакциях в миокарде. Целью настоящей работы является моделирование действия провоспалительных цитокинов в сердечной ткани и определение уровня PAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 в данных условиях.

В качестве модельной системы была использована культура кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (КМ-ИПСК) [1]. Содержание кардиомиоцитов в полученной культуре, определенное методом иммунохимического окрашивания, составило 95% от общего количества клеток. В КМ-ИПСК было проведено моделирование воспалительных реакций под действием фактора некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкина- 1β (IL- 1β), интерлейкина-6 (IL-6) в диапазоне концентраций от 10 - 40 нг/мл. При стимуляции КМ-ИПСК провоспалительными цитокинами уровень белка p65, определенный методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител, возрастал примерно в 2 раза, что говорит о развитии воспалительного ответа в КМ-ИПСК. Методом флуороиммунного анализа (ФИА) с использованием пары антител, специфичных к неопитопу, образующемуся в результате специфического протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A, были определены концентрации протеолитических фрагментов IGFBP-4 до и после стимуляции провоспалительными цитокинами. Было обнаружено, что после стимуляции провоспалительными цитокинами КМ-ИПСК уровень PAPP-A-специфического протеолиза IGFBP-4 увеличивался по сравнению с нестимулированными КМ-ИПСК в 1,5-2 раза как при стимуляции индивидуально TNF α , IL- 1β и IL-6, так и при стимуляции различными комбинациями провоспалительных цитокинов.

Таким образом, в настоящей работе показано, что PAPP-A-специфичная деградация IGFBP-4 в кардиомиоцитах возрастает при воздействии на них провоспалительными цитокинами. Результаты настоящей работы позволяют предположить, что увеличение уровня кардиоспецифического протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A при сердечной недостаточности ассоциировано с воспалительными процессами, протекающими в сердечной мышце.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ Mycoplasma hominis И ЛАБОРАТОРНОГО ШТАММА Н-34

Галямина М.А., Побегуц О.В., Смирнов И.П., Букато О.Н., Горбачев А.Ю.

Лаборатория протеомного анализа

Mycoplasma hominis (*M. hominis*) относится к классу Молликут и является условным патогеном человека, вызывающим острые и хронические инфекции урогенитального тракта. В последнее время стало известно, что она может адгезироваться к клеткам крови, распространяться по всему организму и населять другие органы и ткани, вызывая генерализованную инфекцию. Для нее характерны отсутствие клеточной стенки и редуцированный размер генома (570 генов, кодирующих белок, для штамма Н-34). С помощью масс-спектрометрического анализа на системе Ultimate 3000 RSLC nanoHPLC, соединенной с масс-спектрометром QExactive Plus (Thermo Fisher Scientific) проведен сравнительный количественный анализ протеомов 9 клинических изолятов *M. hominis* и лабораторного штамма Н-34. Все штаммы были выращены на среде ВНИ с добавлением аргинина в качестве источника углерода. Идентифицировано около 65% белков протеома. *M. hominis* не имеет клеточной стенки, поэтому мембрана является основным посредником, обеспечивающим ее взаимодействие с окружающей средой. Липопротеины микоплазмы выполняют множество функций, начиная от поглощения питательных веществ и заканчивая адгезией, вирулентностью и иммуномодулирующей активностью. Количественный анализ представленности белков с помощью программного обеспечения MaxQuant 1.5.2.8 показал, что для клинических изолятов характерно существенная перестройка представленности мембранных белков. Во всех клинических изолятах мы наблюдаем значительное падение уровня липопротеинов P120, P80, P60, LemA, Md1, Md2, МНО_5330, МНО_3620 и ABC и транспортера МНО_3530 и значительное увеличение уровня цитадгезина Vaa, липопротеинов Lmp3 и МНО_2620. Известно, что липопротеины P80, P60, Vaa, и ABC транспортер OrpA участвуют в цитадгезии. Поверхностные белки Vaa, P120 и Lmp распознаются гуморальным иммунитетом хозяина и являются вариabельными поверхностными антигенами. Мы также наблюдаем снижение уровня белка клеточного деления FtsZ, что согласуется с замедлением клеточного роста клинических изолятов по сравнению с лабораторным штаммом. Анализ представленности ферментов энергетического метаболизма показал, что у части клинических изолятов активизируется путь утилизации нуклеозидов (растет уровень белков Deo-оперона) и у всех снижается активность пути утилизации аргинина (падает уровень основных ферментов аргинин-дегидралазного пути - аргинин деиминазы и орнитинтранскарбамилазы). Мы ранее показали, что *M. hominis* может использовать нуклеозиды в качестве источника углерода. Этот путь энергетического метаболизма менее выгоден с точки зрения получения энергии. Мы показали, что при неблагоприятных условиях *M. hominis* переключает свой метаболизм на менее выгодный с целью замедления роста, что является одним из механизмов ее устойчивости к неблагоприятным воздействиям. Мы предполагаем, что переключение энергетического метаболизма в сторону утилизации нуклеозидов у клинических изолятов связана с их адаптацией в организме хозяина. Мы также определили, что в клинических изолятах значительно растет уровень одного из компонентов системы рестрикции-модификации (PM)1 типа – белка HsdM. Предполагается, что системы PM преимущественно функционируют для защиты от вторжения чужеродной ДНК, однако было также показано, что они могут выполнять и неклассические функции, участвуя в фазовых вариациях и регуляции экспрессии генов. Мы предполагаем, что система PM I типа может участвовать в формировании вирулентного фенотипа *M. hominis*, способного выживать и персистировать в организме хозяина.

ГЕНЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *MEF* И *ERMV* И ИХ РОЛЬ ПРИ ПОДБОРЕ ДОНОРОВ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ

Господарик А. В., Улаханова Л. А., Есиев С. С., Шанский Я. Д., Беспярых Ю. А.
Лаборатория молекулярной медицины, Центр молекулярной медицины и диагностики

На сегодняшний день трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) становится все более востребованным подходом к коррекции дисбиоза микробиоты, обусловленного различными патологическими состояниями. Подбор донора является одним из наиболее важных и значимых этапов для ТФМ. Особое внимание в последнее время уделяют проблеме наличия генов устойчивости к разным группам антибиотиков в биоматериале.

Целью исследования было провести анализ встречаемости генетических маркеров лекарственной устойчивости *mef* и *ermB* среди разных возрастных групп населения, включая младенцев на грудном вскармливании.

Всего в исследование включено 52 образца биологического материала, включая 46 образцов кала и 6 образцов грудного молока. Для установления вероятного минимального возраста формирования носительства и путей передачи генов резистентности *mef* и *ermB* сформирована группа «мать-дитя» (кормящая мать/ребенок на грудном вскармливании, 6 пар). Анализ проводили с использованием моноплексного набора «РЕЗИСТОМ.Mef» (выявление *mef*-генов резистентности *Streptococcus* spp. к макролидам) и «РЕЗИСТОМ.ErmB» (выявление *erm*-генов резистентности *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp. к макролидам, линкозамидам и стрептомицину В) формата ФЛУОРОПОЛ-РВ («Литех»; Россия) методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories; США). Бактериологический посев кала проводили согласно методическим рекомендациям «Бактериологическая диагностика дисбактериоза».

Анализ микробиологического состава кала 23 потенциально здоровых добровольцев показал, что только 8.7% участников исследования имеют соответствующую нормам микробиоту дистальной части кишечника и могут быть рассмотрены в качестве потенциальных доноров для ТФМ. При анализе генетических маркеров лекарственной устойчивости к макролидам линкозамидам и стрептомицину В выявлено, что все 23 потенциально здоровых добровольца являются носителями обоих генов (*mef* и *ermB*). Для установления возможного возрастного периода появления данных генов, связи их наличия непосредственно с приемом антибактериальных препаратов и путей передачи была сформирована и проанализирована выборка добровольцев «мать-дитя» и детей разных возрастных групп. Анализ генов резистентности *mef* и *ermB* проводили не только на образцах кала, но и дополнительно в образцах грудного молока. Ген устойчивости к макролидам (*mef*) среди разных возрастных групп был выявлен в 97.8% образцах кала, ген устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограмину (*ermB*) — в 93.5%. В отдельно выделенной группе «мать – дитя» ген *mef* обнаружен во всех образцах грудного молока и кала. Ген *ermB* в этой группе подтвержден в 3 из 6 образцов грудного молока и 4 из 6 образцов кала младенцев.

Таким образом ввиду того, что гены *mef* и *ermB* были выявлены не только у взрослого населения, но и в столь раннем возрасте нами было выдвинуто предположение, что использование трансплантата (кала), содержащего данные гены, допустимо для ТФМ. Представленные данные могут помочь клиницистам, внедряющим методику ТФМ в практику, при самостоятельном поиске доноров и подготовке биоматериала.

Работа выполнена при поддержке гранта АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении» № 2412-31

ПРОТЕОЛИЗ IGFBR-4 ПОД ДЕЙСТВИЕМ RAPP-A В КЛЕТКАХ НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Г.А. Дя^I, О.С. Лебедева^{II,III}, А.Б. Постников^{IV}, М.А. Лагарькова^{II,III}, А.Г. Катруха^I, Д.В. Серебряная^I

^IГруппа адаптивных клеточных механизмов, Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Moscow, Russia, ^{II}Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия, ^{III}Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия, ^{IV}HuTest, Турку, Финляндия

Среди нейродегенеративных заболеваний болезнь Паркинсона занимает второе место по смертности в мире. Болезнь Паркинсона характеризуется гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга. В связи с этим, исследование адаптивных клеточных механизмов, активирующихся при развитии болезни Паркинсона, представляет актуальный научный интерес. Одними из факторов, поддерживающих жизнеспособность клеток нервной ткани, являются инсулиноподобные факторы роста, IGF-1 и IGF-2. Биологическая доступность IGF для их клеточных рецепторов регулируется под действием специфических протеаз, расщепляющих комплекс IGF-связывающих белков (IGFBP) с IGF. В тканях и клеточных линиях протеолиз IGFBP-4 осуществляется димерной формой протеазы RAPP-A (pregnancy associated plasma protein A). RAPP-A является единственной известной протеазой, осуществляющей специфический протеолиз IGFBP-4 в физиологических условиях. Протеолиз IGFBP-4 под действием RAPP-A протекает по специфическому сайту с образованием N-концевого (NT-IGFBP-4) и C-концевого фрагментов IGFBP-4 (CT-IGFBP-4). Целью настоящей работы было изучить протекание RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 в нейронах и астроцитах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), в норме и при болезни Паркинсона.

Нами была разработана модельная система для исследования протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A в культурах нейронов и астроцитов, дифференцированных из ИПСК. Методом флуороиммунного анализа (ФИА) «сэндвич-типа» с использованием неозпитоп-специфичной пары антител было показано, что протеолиз IGFBP-4 под действием RAPP-A протекает в культурах нейронов и астроцитов, полученных из ИПСК трех здоровых доноров и двух пациентов с болезнью Паркинсона. В случае здоровых доноров уровень протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A выше в астроцитах, чем в нейронах примерно в 2,5 раза и коррелирует с концентрацией RAPP-A, измеренной методом ФИА «сэндвич-типа». В случае нейронов и астроцитов, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Паркинсона, уровень RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 протекает приблизительно на одинаковом уровне. Следует отметить, что уровень RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в нейронах при болезни Паркинсона выше примерно в 3 раза, чем в случае нейронов, полученных из здоровых доноров.

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют предположить, что астроциты, секретировав RAPP-A, могут способствовать увеличению биологической доступности IGF для клеток нервной ткани в здоровом состоянии и тем самым поддерживать их жизнеспособность. Этот механизм может иметь значение также и при развитии нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Паркинсона, поскольку усиление ассоциированного с нейронами уровня протеолиза IGFBP-4 может способствовать увеличению биологической доступности IGF для нейронов и поддержанию их жизнеспособности аналогичным образом.

РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ

Земская А.С., Щербакова А.С., Козлов М.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений

Гистондеацетилазы (HDACs) – это большое семейство цинк-зависимых деацетилаз, в котором по субстратным и функциональным особенностям выделяют три важнейших класса: I, IIА и IIВ. Белки этих классов являются мишенями для терапии раковых и вирусных заболеваний, а также метаболических нарушений, таких как стеатоз и диабет. Селективность ингибиторов HDACs определяет механизмы их действия, и, следовательно, актуальной задачей является первоначальное определение селективности ингибиторов с точностью до класса. Существующие на данный момент методы либо не отражают реальный клеточный ответ на тестируемые соединения (*in vitro*, на рекомбинантных ферментах), либо являются дорогостоящими и трудоёмкими (*in cell*, вестерн-блот анализ).

В большинстве описанных методик определение селективности ингибиторов HDACs проводят в клеточных лизатах с добавлением лизин-содержащих флуоресцентных субстратов [1]. Самыми популярными субстратами являются ацетильное и трифторацетильное Вос-защищенные производные лизина, конъюгированные с флуоресцентным аминокумарином (АМС): Вос-Lys(Ac)-АМС и Вос-Lys(Tfa)-АМС – субстраты HDAC класс I/IIВ и HDAC класс IIА, соответственно. Кроме того, опубликован субстрат Вос-Lys(Cro)-АМС, ω-амид кротоновой кислоты, который проявляет повышенное сродство к HDACs класса I. Параллельное использование этих трех субстратов для анализа одного соединения позволяет определить селективность ингибиторов HDACs с точностью до класса. Мы подобрали условия проведения анализа с клетками гепатомы человека линии Huh7, таким образом, чтобы продукты деацетилирования каждого из исходных субстратов надежно детектировались в кондиционированной клеточной среде.

Таким образом, создана тест-система для первичной оценки селективности ингибиторов функционально важных HDACs с точностью до класса, которая более приближена к реальной ситуации в клетке, чем тестирование на ферментах, а также является менее затратной, чем вестерн-блот. Возможности системы были продемонстрированы на примерах известных ингибиторов HDACs – противораковых препаратах (вориностат, белиностат и др.). Кроме того, тест-система потенциально пригодна для скрининга низкомолекулярных модуляторов экспрессии HDACs по определению выхода деацетилирования субстратов, что позволяет избежать на этом этапе более трудоёмкий ПЦР анализ.

[1] Potluri, V., Shandil, R.K., Gavara, R. *et al.* Discovery of FNDR-20123, a histone deacetylase inhibitor for the treatment of Plasmodium falciparum malaria. *Malar J*, 2020, **19**, 365.

Исследование поддержано грантами РФФИ № 20-04-00504, РФФ № 20-74-10121.

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ PFAPA-СИНДРОМА

Котова Е.Н., Баранов К.К., Вязьменов Э.О., Протасов А.А., Иванов В.А., Беспярых Ю.А.

Отделение отоларингологии, Центр молекулярной медицины и диагностики

PFAPA-синдром, описанный в 1987 году G.S. Marshall, включает в себя периодическую (каждые 1-2 месяца) стойкую лихорадку до 39-40°C, афтозный стоматит, фарингит, шейный лимфаденит. Диагностической пробой при обострении выступает стремительный регресс симптомов при применении кортикостероидов. Оценка распространенности синдрома затруднена из-за дебюта заболевания в раннем детском возрасте, совпадающем с высокой заболеваемостью банальными инфекциями. В настоящее время заболевание относят к наследственным аутовоспалительным мультифакториальным синдромам, при котором модифицирующую роль играют средовые факторы, в частности персистенция вирусов в структурах лимфоузлов.

Под нашим наблюдением находился пациент с вышеописанным симптомокомплексом с 15-ти месячного возраста. Проба с Дексаметазоном положительная. По результатам серологической диагностики и анализа слюны на ДНК неоднократно выявлялись ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ VI. Ребенок получал курсы противовирусной терапии по назначению инфекционистов без эффекта. К 3 годам у пациента диагностирована гипертрофия аденоидов III степени. Отмечалось стойкое нарушение носового дыхания, храп, апноэ сна. Ребенку была проведена аденотонзиллэктомия. Хирургическое вмешательство и послеоперационный период протекали без особенностей.

Полученный в ходе операции образец ткани был незамедлительно помещён в 10% забуференный формалин и передан в лабораторию Молекулярной медицины ЦММиД для проведения гистологического исследования: в гистологической картине миндалин определялись признаки гиперплазии с увеличением количества лимфоидных фолликулов. Снижена клеточность герминативных центров. Отмечено очаговое утолщение многослойного плоского неороговевающего эпителия с выраженной инфильтрацией.

ПЦР диагностика не выявила наличие ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ VI в операционном материале. В течение 6 месяцев эпизодов PFAPA-синдрома не отмечено.

Выводы: Информированность специалистов о PFAPA-синдроме способствует повышению качества оказываемой помощи и снижает объем необоснованной медикаментозной терапии. Гипотеза развития синдрома, связанная с персистенцией герпесвирусов в структурах лимфоузлов, требует дальнейшего изучения. Купирование синдрома после аденотонзиллэктомии обосновывает поиск этиопатогенетического фактора в миндалинах.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ИЗ *ESCHERICHIA COLI*

Ли А.В., Горбачев А.Ю.

Лаборатория протеомного анализа

Выделение нуклеиновых кислот - важнейший шаг подготовки проб перед дальнейшим анализом. Большинство процессов, таких как проведение обратной транскрипции, детектирование накопления продуктов амплификации методом ПЦР в реальном времени, секвенирование и другие не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительной очистки РНК. Для проведения транскриптомного анализа генов *Escherichia coli* (*E. coli*) нам необходимо было выделить очищенную РНК данной бактерии.

Классические методы выделения нуклеиновых кислот включают в себя лизис биологического материала специальными реагентами или механическим путем. Широко используемым реагентом для выделения РНК является TRIzol™. Это однофазная смесь фенола и гуанидин-изотиоцианата, разработанная для выделения фракций ДНК, РНК и белков из одного и того же биологического образца. Однако стандартный реагент TRIzol™ не работает эффективно для *E. coli* из-за наличия клеточной стенки, устойчивой к его действию. Имеющиеся коммерческие наборы для выделения РНК требуют предварительной гомогенизации, что увеличивает вероятность деградации нуклеиновых кислот, к тому же при выделении на колонках происходит потеря части образца.

Нами был получен протокол для выделения РНК из клеток *E. coli* путем нагревания клеток в смеси 98% формамида и 10 мМ ЭДТА. Формамид представляет собой растворитель, который денатурирует нуклеиновые кислоты и белки. Аналогичное использование формамида было описано ранее в методе выделения РНК для дрожжей [1].

Чтобы лучше охарактеризовать РНК, выделенную с помощью формамида-ЭДТА, мы сравнили ее с РНК, полученной широко используемым тризольным методом и с РНК, выделенной с помощью коммерческого набора PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США). РНК, выделенная реагентом TRIzol™, сильно уступает в конечном выходе и не определяется при проведении электрофореза в агарозном геле. С помощью коммерческого набора можно получить большое количество РНК с хорошими показателями очищенности, однако мы не видим всей представленности РНК, отсутствует 5S субъединица рибосомальной РНК и другие малые РНК за счет переосаждения на колонках. Выделенная формамидом-ЭДТА РНК имеет хороший выход, показатели очищенности, более полную представленность молекул РНК разных размеров (5S, 16S и 23S) и может быть использована для электрофоретического разделения без дополнительной обработки. Для использования РНК в ферментативных реакциях и других ситуациях, когда требуется очень чистая РНК, образцы, экстрагированные формамидом-ЭДТА, можно разбавлять водой с последующими стандартными методами очистки, такими как переосаждение этанолом или изопропанолом, экстракция фенолом/хлороформом или очистка коммерческими реагентами.

Таким образом, при выделении РНК формамидом-ЭДТА используются недорогие реагенты, отсутствует необходимость механического лизиса клеток и эффективно извлекается широкий спектр РНК. Следовательно, данный метод наилучшим образом подходит для дальнейшего изучения транскриптома методом секвенирования.

Список используемой литературы:

1. Shedlovskiy D, Shcherbik N, Pestov DG. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. RNA Biol. 2017 Dec 2;14(12):1722-1726. doi: 10.1080/15476286.2017.1345417. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28692404; PMCID: PMC5731811.

ПОДБОР НОВЫХ ЛИГАНДОВ К АПТАМЕРАМ MANGO ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ СИСТЕМ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РНК

Светлова Ю.И., Хрулев А.А., Ходорович Ю.М., Аралов А.В., Варижук А.М.

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Для визуализации РНК в клетке широко применяется присоединение к ней аптамера (G-квадруплексной последовательности) и последующая обработка аптамерспецифичным флуорогеном, «разгорающимся» при образовании комплекса. Таким образом получается система, позволяющая отслеживать РНК *in vivo* в реальном времени при помощи флуоресцентной микроскопии. Одной из самых популярных систем визуализации РНК является сочетание G-квадруплексной последовательности из серии Mango I-IV и лиганда на основе тиазолового оранжевого (TO1-biotin). Второй наиболее популярный флуороген, DFHBI в комплексе со своим аптамером Broccoli, имеет близкие значения поглощения и испускания с TO1-biotin. Для создания мультиплексных систем, позволяющих отслеживать две разные молекулы РНК с разными метками, требуется расширение спектрального диапазона.

Целью нашей работы стал подбор к аптамерам Mango II, IV флуорогена на основе TO1-biotin со смещенным максимумом испускания флуоресценции и проверки его ортогональности паре DFHBI-Broccoli. Для этого перед собой мы поставили следующие задачи: 1) провести сравнительный анализ параметров флуоресценции серии аналогов TO1-biotin в комплексе с аптамерами Mango II, IV и выявить соединение-лидер; 2) оценить специфичность флуорогенов и эффект «разгорания»; 3) сравнить параметры флуоресценции лиганда-лидера в комплексе с Mango и параметры флуорогена DFHBI с РНК-аптамером Broccoli.

В результате исследования был отобран флуороген-лидер с максимальным значением Стоксова сдвига. Разница между испусканием DFHBI и поглощением лиганда-лидера составила 70 нм, что достаточно для их независимого друг от друга возбуждения и наблюдения флуоресценции. Подтверждено отсутствие перекрестного сродства в парах, что подтверждает их ортогональность. Полученные результаты открывают возможность дизайна мультиплексных систем визуализации РНК.

РАЗРАБОТКА ПАНЕЛИ ДЛЯ ЦЕЛЕВОГО ОБОГАЩЕНИЯ кДНК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ MGISEQ

Сикамов К.В.^{1,2}, Горбачев А.Ю.¹

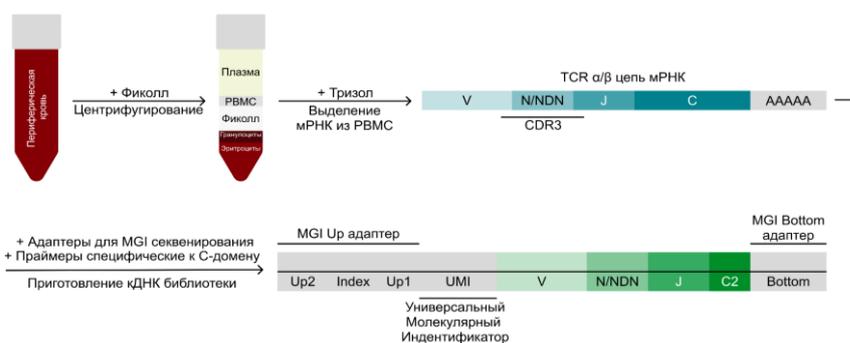
¹Лаборатория протеомного анализа ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Т-клеточные рецепторы (TCR) состоят из двух белковых цепей – TCR α и TCR β – которые кодируются генами, входящими в состав соответствующих сегментов генома: V, D, J и C, которые за счет генетической рекомбинации случайным образом попадают в состав матричной РНК. Наибольший интерес в последовательности транскрипта представляет область CDR3, поскольку именно она определяет способность Т-лимфоцитов специфически распознавать антиген, что и является основным механизмом работы иммунной системы организма.

Для исследования клонотипов Т-клеток в образцах периферической крови человека была разработана панель для целевого обогащения кДНК последовательностями Т-клеточных рецепторов для технологии секвенирования MGISEQ. Процесс приготовления кДНК библиотеки [1] (Рисунок 1) начинается с разделения фиколлом, во время центрифугирования, периферических мононуклеарных клеток, далее из которых выделяется РНК при помощи тризола. После этого подготовленные образцы РНК, используются в качестве матрицы для синтеза кДНК во время обратной транскрипции. На завершительных стадиях протокола синтезированная кДНК амплифицируется специфическими последовательностями олигонуклеотидов, которые комплементарно гибридизуются в С-домене TCR генов. Разработанная панель позволяет вводить технические последовательности олигонуклеотидов – адаптеры, для секвенирования образцов на платформе MGISEQ-2000 – двумя различными способами: (1) при помощи полимеразной цепной реакции во время целевой амплификации кДНК или (2) с использованием лигирования.

Рисунок 1. Схема протокола приготовления кДНК библиотеки



Таким образом, разработанная по результатам данной работы панель позволяет получать данные секвенирования репертуаров Т-клеточных рецепторов для их последующего анализа: биоинформатического профилирования с целью поиска последовательностей CDR3 региона, ассоциированных с исследуемым заболеванием.

Литература

1. Mamedov, I. Z., Britanova, O. V., Zvyagin, I. V., Turchaninova, M. A., Bolotin, D. A., Putintseva, E. V., Lebedev, Y. B., & Chudakov, D. M. (2013). Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Frontiers in immunology*, 4, 456.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК ПУТЁМ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ МАКАКИ-РЕЗУС

Федоренко А. В., Голиусова Д. В., Лебедева О. С., Богомазова А. Н.

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

В регенеративной медицине при доклинических испытаниях медицинских технологий, направленных на терапию заболеваний и травм центральной нервной системы (ЦНС), нередко встает необходимость использования приматов и, в частности, макак-резус (*Macaca mulatta*). Для терапии спинальной травмы в настоящее время разрабатывают протоколы клеточной терапии с использованием нейральных предшественников, полученных при помощи направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Процесс получения ИПСК макаки-резус заметно отличается по процедуре репрограммирования по сравнению с человеческими клетками. В данной работе мы описываем подбор условий и оптимизацию процесса репрограммирования фибробластов кожи макаки-резус для получения ИПСК. При оптимизации репрограммирования во всех тестируемых вариантах мы использовали лентивирусную доставку факторов репрограммирования: OCT4, KLF4, SOX2, C-Мус. Мы определили необходимый МОI лентивирусов, целесообразность использования фидерного слоя и гипоксических условий культивирования. Также мы определили оптимальные концентрации малых молекул, ростовых факторов и цитокинов, включая цитокин LIF.

Исследование проведено в рамках государственного задания: № НИР 122040800024-3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННОГО КОЛИТА У КРЫС

Шагалеева О.Ю.¹, Кардонский Д.А.¹, Иванов В.А.², Конанов Д.Н.³, Кашатникова Д.А.¹,
Силантьев А.С.¹, Филатова Ю.В.¹, Зоркина Я.А.⁴, Абрамова О.В.⁴, Зубков Е.А.⁴,
Морозова А.Ю.⁴, Захаржевская Н.Б.¹

¹ Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

² Центр молекулярной медицины и диагностики ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

³ Лаборатория математической биологии и биоинформатики НИИ СБМ Роспотребнадзора

⁴ Лаборатория экспериментальной нейробиологии ФГБУ НМИЦ ПН им. В.П. Сербского

Введение: Одна из относительно простых и воспроизводимых моделей воспалительных заболеваний кишечника является - DSS (Dextran sulfate sodium) индуцированный колит. Модель позволяет воспроизводить как острое, так и хроническое воспаление из-за возможности модификации доз и циклов лечения/индукции. Данное исследование было направлено на воспроизведение DSS модели у крыс с последующей оценкой развития воспаления, а также анализом естественной регенерации тканей после прекращения действия DSS гистологическими и молекулярными методами.

Материалы и методы: Исследование проводилось на самках крыс линии Wistar. Возраст крыс составлял 2-3 месяца. Крысы были разделены на три группы: 7DSS (n=5), 14DSS (n=5), K (n=10). Перед началом эксперимента и каждые 3 дня производили взвешивание крыс, для оценки потери массы в ходе эксперимента. В течение всего эксперимента группа K (контрольная) получала питьевую воду. Группы 7DSS и 14DSS получали 4% водный раствор DSS (Dextran sulfate sodium salt, Mr ~40,000, Alfa Aesar) в течение 7 дней, который находился в свободном доступе. На седьмой день крыс из группы 7DSS выводили из эксперимента. Группа 14DSS в следующие 7 дней получала питьевую воду. На 14 день крыс группы контроля и 14DSS выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Взятие образцов кала производили через каждые 3-4 дня для анализа развития воспаления с последующей детекцией летучих органических соединений с помощью газожидкостной хроматографии с парофазным способом экстракции. Для гистологического исследования ободочную кишку извлекали из брюшной полости, разрезали вдоль, скручивали в "Swiss roll" для оценки всех отделов кишки. Окрашивали гистологические образцы гематоксилином и эозином.

Результаты: на 5-е -7-е сутки в группах 7DSS и 14DSS наблюдались диарея и диарея с примесью крови. Отмечалось снижение массы животных и двигательной активности. Однако после прекращения действия DSS уже на 12-14 сутки в группе 14DSS животные внешне почти не отличались от контрольной группы, стул был оформленным. При гистологическом анализе тканей ободочной кишки были выявлены основные признаки воспаления, в группе 7DSS 1-5 наиболее выраженные патологические изменения были представлены участками изъязвления с выраженной инфильтрацией лимфоцитами и нейтрофилами. В группе крыс 14DSS по истечению 14 дней зоны изъязвления были менее выраженными с признаками реэпитализации. Согласно данным, полученным с помощью парофазного газохроматографического анализа, соотношение летучих органических соединений значительно отличалось во всех анализируемых группах.

Выводы: DSS модель индуцированного колита показала изменения как на тканевом уровне, так и на уровне метаболитов, в момент обострения и ремиссии воспалительных процессов.

Работа финансируется из средств гранта: РФФ 21-75-10172

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ЛИЦ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ИММУНИТЕТА К КОРОНАВИРУСУ SARS-CoV-2

Шанский Я.Д., Господарик А.В., Комарова А.В., Серкина А.С., Беспярых Ю.А.
Лаборатория молекулярной медицины, Центр молекулярной медицины и диагностики

Актуальность. Новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызываемая выделенным в 2019 г. серотипом РНК-содержащего коронавируса – SARS-CoV-2, характеризуется высокой контагиозностью и большой частотой поражения дыхательной и ряда других систем человеческого организма. Иммуный ответ на попадание SARS-CoV-2 в организм человека включает выработку специфических иммуноглобулинов (Ig) – IgA, IgM и IgG. Последние вырабатываются как к структурному белку нуклеокапсида (N-белок), так и гликопротеину, отвечающему за проникновение в клетку (S-белок). В зависимости от типа и уровня содержания Ig, можно сделать вывод о стадии заболевания (начальной, выздоровления). Основным подходом к определению Ig в биологических жидкостях человека является неконкурентный иммуноферментный анализ (ИФА).

Целью настоящей работы было провести сравнительный анализ содержания IgA, IgM и IgG к SARS-CoV-2 и N-антигена в сыворотке крови добровольцев с различным типом иммунитета к COVID-19.

Материалы и методы. В исследование включено 82 образца сыворотки крови от добровольцев мужского и женского пола от 18 до 50 лет с соблюдением этических стандартов. Образцы сыворотки крови были стратифицированы следующим образом: 1) не болевшие и не привитые от SARS-CoV-2 (контроль; $n=10$); 2) вакцинированные препаратом «КовиВак», 35-й день ($n=10$); 3) вакцинированные препаратом «КовиВак», 172-й день ($n=10$); 4) вакцинированные препаратом «Гам-Ковид-Вак» ($n=18$); 5) с подтвержденной перенесенной инфекцией COVID-19 ($n=10$); 6) вакцинированные препаратом «КовиВак» и перенесшие подтвержденную инфекцию COVID-19 ($n=10$); 7) вакцинированные препаратом «Гам-Ковид-Вак» и перенесшие подтвержденную инфекцию COVID-19 ($n=8$).

В образцах сыворотки крови методом ИФА определяли следующие показатели: 1) качественное содержание IgG к коронавирусу (Вектор-Бест, Россия; Имбиан, Россия); 2) количественное содержание IgG к коронавирусу (Вектор-Бест, Россия; Литех, Россия); 3) количественное содержание IgG к поверхностному гликопротеину S SARS-CoV-2 (Имбиан, Россия); 4) количественное содержание IgG к рецептор-связывающему домену (RBD) SARS-CoV-2 (Имбиан; Аллель, Россия); 5) индекс авидности IgG к RBD SARS-CoV-2 (Имбиан, Россия); 6) качественное содержание IgM (Имбиан, Россия); 7) качественное содержание IgA к коронавирусу (Имбиан, Россия); 8) количественное содержание N-белка коронавируса (Имбиан, Россия).

Результаты. Качественный и количественный уровень IgG выше во всех группах в сравнении с контролем; наиболее высок он у вакцинированных лиц, перенесших также COVID-19 (коэффициент позитивности, КП/BAU/мл: 9.49/285.0, 8.48/639.3, 15.15/1648.2, 0.11/<5.0 для переболевших, вакцинированных, переболевших и вакцинированных, невакцинированных). Уровень IgG к RBD S-белка у переболевших без вакцинации был ниже, чем у вакцинированных (25.2 и 726.6 BAU/мл соответственно). Индекс авидности IgG является наибольшим для невакцинированных (1.09) и наименьшим – для переболевших (0.24). Уровень IgM у переболевших (КП 2.6–2.9), значимо выше, чем в других группах (КП 0.95–1.18), вне зависимости от типа вакцинации. Уровни N-антигена и IgA не различаются между группами (N-антиген 0.0–196.0 пг/мл; КП IgA 0.13–0.33). Полученные данные свидетельствуют о различном профиле гуморального ответа при вакцинации и перенесенной инфекции COVID-19.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-2988.2022.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПА ЦИТОХРОМОВ P450 ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТАБОЛИЗМА ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ПСИХИАТРИИ

Эсибов А.А., Горбачев А.Ю., Кулемин Н.А.

Лаборатория протеомного анализа

Активность ферментов, метаболизирующих лекарственные средства, часто варьирует в значительных пределах у здоровых людей. Известны генетические факторы, влияющие на фармакодинамику и фармакокинетику лекарственных веществ. При этом фармакогенетические различия могут иметь клинические последствия. Пациентам, быстро метаболизирующим определенные препараты, понадобится более высокая дозировка или более частая кратность приема. И, наоборот, пациенты, медленно метаболизирующие препараты, будут иметь повышенный риск развития побочных эффектов и нуждаются в снижении стандартной дозировки, указанной в инструкции к лекарственному препарату.

Основными ферментами, участвующими в метаболизме лекарственных средств, являются цитохромы семейства P450. Мы проанализировали 7 основных генов цитохромов, участвующих в инактивации более 90% всех известных препаратов на образцах из базы данных GeT-RM, а также из собственной базы данных различными программами для генотипирования. Нами были протестированы данные полногеномного секвенирования, полноэкзомного секвенирования и предложен алгоритм анализа смешанных данных, содержащих экзоны, полногеномные сиквенсы с низким покрытием, и единичные полиморфизмы, определенные методом ПЦР. Целью работы является освещение фармакогенетических особенностей активности системы цитохромов P450, а также алгоритм определения генотипа цитохромов на данных секвенирования следующего поколения. Сделаны выводы по результатам работы предложенного алгоритма анализа смешанных данных.