

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Ю.М. ЛОПУХИНА
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

**ИТОГОВОЙ НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина
ФМБА РОССИИ**

Москва 19-20 декабря 2023

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

ВОЗМОЖНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПАЦИЕНТОК ПОСЛЕ ЦИТОРЕДУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ И НРЭС. КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Абдуллаев А.Г., Провоторов Ю.А., Нечаенко А.М., Антонов В.В.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Хирургическое отделение

Интраперитонеальная диссеминация (карциноматоз) наиболее часто обусловлена злокачественными опухолями желудка, яичников, толстой кишки, как правило, сопровождается плохим прогнозом и определяется рядом факторов – распространенностью, уровнем дифференцировки опухоли, чувствительностью к системной химиотерапии и пр. С другой стороны, существует ряд заболеваний, которые также характеризуются преимущественным поражением брюшины, но при этом обладают пограничной злокачественностью, например, псевдомиксома, ассоциированная с Low grade опухолью червеобразного отростка, мультикистозная, папиллярная или эпителиодная мезотелиома и др. Прогноз указанных болезней в настоящее время удалось значительно улучшить благодаря внедрению циторедуктивных операций без- или в сочетании с интраперитонеальной системной химиотерапией. Этапы и принципы циторедуктивных операций стандартизованы и известны. Для удаления всех видимых проявлений болезни может потребоваться мультивисцеральная резекция, перитонэктомия, удаление большого сальника. Часто при перитонеальном карциноматозе поражаются матка и яичники, поэтому экстирпация матки с придатками может быть необходима для получения полной циторедукции (СС-0), но это неизбежно приводит к ятрогенной хирургической менопаузе и бесплодию. Таким образом, возможности сохранения репродуктивной функции у таких больных – вопрос дискуссионный, который мы попытались рассмотреть на конкретном клиническом примере.

Больная проходила обследование по месту жительства по поводу бесплодия. Осенью 2011 года выполнена диагностическая видеолaparоскопия, во время которой обнаружен кистозный канцероматоз брюшины, выполнена биопсия. При гистологическом исследовании получены данные о мультикистозной мезотелиоме.

Выполнена циторедуктивная операция –перитонэктомия куполов диафрагмы и латеральных каналов, тотальная тазовая перитонэктомия с резекцией дна мочевого пузыря и сохранением матки и яичников. Бурсоментэктомия. Проведена процедура гипертермической интраперитонеальной химиоперфузии аппаратом SunChip в «открытом» контуре при средней температуре перфузата 43С, цисплатин 100мг, 60 минут.

Спустя 9 лет, в 2019 г. установлена первая беременность — две недели. При УЗИ на сроке 8 недель и 2 дня в матке визуализируется два плодных яйца с двумя живыми плодами. В последующем в течение беременности отмечалась угроза прерывания на 9-10 и 15 неделях, на 26 неделе – гестационная анемия, 34 неделя – гестационная тромбоцитопения легкой степени без геморрагического синдрома.

По месту жительства (г. Волгоград) на 37 неделе было произведено родоразрешение (корпоральное кесарево сечение). Извлечена дихориальная диамниотическая двойня с оценкой по шкале Апгар 8–8 баллов. В динамике ранней неонатальной адаптации отмечались клинические проявления неонатальной желтухи с 4-х суток, по поводу чего проводилась терапия с уменьшением интенсивности гипербилирубинемии и желтухи. В настоящее время дети здоровы, развиваются соответственно возрасту.

САМОСОБИРАЮЩИЕСЯ АМИЛОИДОПОДОБНЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ S1, S2, RBD И N КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

Морозова О. В.^{1,2,3}, Манувера В. А.^{1,3}, Баринов Н. А.^{1,3}, Лазарев В. Н.^{1,3}, Клинов Д. В.^{1,3}.

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Лаборатория медицинских нанотехнологий, Москва

² Ивановский институт вирусологии Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

³ Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Московская область

Введение. В настоящее время круглогодично и повсеместно циркулируют четыре сезонных коронавируса человека (α -коронавирусы HCoV-229E, HCoV-NL63, β -коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NKU1), а также два высокопатогенных β -коронавируса (возбудитель ближневосточного респираторного синдрома (Meadle East respiratory syndrome (MERS-CoV)) и SARS-CoV-2, ответственный за пандемию атипичной пневмонии COVID-19. Мутагенез РНК-содержащих вирусов, генетические перестройки квазивидов и отсутствие систем репарации РНК обуславливают изменчивость коронавирусов, ускользание от иммунного ответа хозяев и риск роста заболеваемости. Рекомбинантные фрагменты белков вирионов S1, S2 и полноразмерный белок N были выделены из трансформированных бактериальных клеток *Escherichia coli*, рецептор-связывающий домен RBD гликопротеина S выделен из трансфицированных эмбриональных клеток почки человека 293Exr1 методом аффинной хроматографии. Электрофорез в SDS-ПААГ показал соответствие размеров рекомбинантных белков SARS-CoV-2 теоретически ожидаемым и отсутствие примесных белков. Очищенные белки применяли с 2020 года для иммуноферментного (ИФА) и иммунофлуоресцентного анализа с использованием магнитных микросфер (xMAP) для детекции специфических антител в сыворотках крови больных COVID-19.

Цель: анализ наноструктур в очищенных рекомбинантных белках коронавируса SARS-CoV-2.

Результаты. Самособирающиеся наночастицы (НЧ) и нановолокна были обнаружены в рекомбинантных белках S1, S2, RBD и N коронавируса SARS-CoV-2, очищенных методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы. Сканирующая электронная (СЭМ), атомно-силовая (АСМ) микроскопия на поверхности слюды или графита и в жидкости, а также динамическое рассеяние света (ДРС) выявили наноструктуры различных размеров. АСМ в жидкой ячейке показала средние размеры S1 НЧ 80 нм, для S2 - 93 нм. Соотношение высоты и радиуса каждой НЧ в диапазоне 0,1–0,5 предполагает наличие твердых белковых НЧ, а не везикул с внутренними пустыми пространствами. Твердые, но не пустые структуры белка НЧ также были подтверждены методом просвечивающей СЭМ после обработки НЧ стандартным контрастирующим агентом уранилацетатом. НЧ остаются стабильными после многократных циклов замораживания-размораживания в воде и гиперосмотических растворах в течение 2 лет при -20° С. Рецепторно-опосредованное проникновение S1 и RBD НЧ в трансформированные клетки почки африканской зеленой мартышки Vero со специфическими рецепторами для проникновения β -коронавируса было более эффективным по сравнению с неспецифическим эндоцитозом в клетки почки собаки MDCK без специфических рецепторов. Амилоидоподобные структуры были выявлены у S1, S2, RBD и N НЧ посредством их взаимодействия с флуоресцентными красителями Тиофлавином Т и Конго красным.

Заключение. НЧ изменяют доступность эпитопов для связывания с антителами, что необходимо учитывать при ИФА и xMAP. Эндоцитоз белковых НЧ в эукариотических клетках изменяет поляризацию врожденного и адаптивного иммунитета. Амилоидные фибриллы могут вызывать протеинопатии, включая конформационные нейродегенеративные заболевания.

Литература: Olga V. Morozova et al., Self-assembling amyloid-like nanostructures from SARS-CoV-2 S1, S2, RBD and N recombinant proteins //Archives of Biochemistry and Biophysics, 9 December 2023, 109843

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ-ПРОДУЦЕНТА РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ ПУТЕМ CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОГО УСИЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ИХ ГЕНОВ.

Бобровский П. А., Графская Е. Н., Манувера В.А., Лазарев В.Н.

Лаборатория генной инженерии

Культивирование эукариотических клеток широко используется в исследованиях и промышленности для производства биотехнологических препаратов. Одним из инструментов такого производства является линия клеток HEK293, которая, в настоящее время, адаптирована для суспензионного культивирования в бессывороточных или химически определенных средах и широко используется для получения рекомбинантных белков. Использование бессывороточных сред повышает стоимость производства, а использование сыворотки в некоторых случаях недопустимо в связи с требованиями фармакологической промышленности о недопустимости использования компонентов животного происхождения при производстве фармакологических субстанций. Сыворотка крови – источник различных ростовых факторов, необходимых для эффективного культивирования клеток. При невозможности ее использования, ростовые факторы и другие белки могут быть добавлены в питательную среду, а могут продуцироваться самим клетками. Ростовые факторы, добавляемые в питательную среду, являются весьма дорогостоящими, к тому же в настоящее время они ограниченно доступны из-за санкционных ограничений. В связи с этим представляется актуальной модификация клеточной линии HEK293, заключающаяся в специфической активации экспрессии ростовых факторов с использованием технологии геномного редактирования. Для работы была использована линия Expi293 – вариант линии HEK293, адаптированный для производства рекомбинантных белков. Для CRISPR/Cas9-опосредованного усиления экспрессии генов ростовых факторов IGF-1, FGF-2, NRF2, EIF3I использовали систему синергичных медиаторов активации – SAM. Были получены лентивирусные частицы, кодирующие компоненты SAM системы. Далее путем трансдукции были получены линии клеток Expi293 с активированной экспрессией одного из генов ростовых факторов (IGF-1, FGF-2, NRF2, EIF3I). С помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени были оценены уровни экспрессии целевых генов. Увеличение экспрессии генов целевых факторов по сравнению с исходной клеточной линией составило от 2-5 до 44-81 раз. Помимо этого, был разработан способ количественного анализа уровня экспрессии генов с помощью петлевой изотермической амплификации (LAMP). Для этого использовали рекомбинантную Bst-полимеразу, полученную в нашей лаборатории и интеркалирующий краситель LUCS 13. Была выявлена корреляция между значениями порогового времени (Tt) LAMP и значениями порогового цикла ПЦР-РВ (Ct). С помощью вестерн-блот гибридизации было показано наличие целевых белков (факторов EIF3, IGF1, FGF2). Проведено пилотное исследование анализа пролиферативной активности модифицированных клеток. В результате сравнения образцов на морфологическом уровне выявлено, что клетки, продуцирующие факторы роста отличаются от немодифицированных клеток эффективностью пролиферации в 1,5 и более раз. Таким образом продемонстрирована принципиальная возможность получения линии-производителя ростовых факторов с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9-SAM. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00012, <https://rscf.ru/project/23-24-00012/>.

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАННЕЙ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ 17-ГО ТИПА

Воловиков Е.А.¹, Смирнова А.С.¹, Емец Е. В.¹, Ануфриева К.С.², Лагарькова М.А.¹, Богомазова А.Н.¹

1 – Лаборатория клеточной биологии; 2 – Лаборатория системной биологии.

Ранняя эпилептическая энцефалопатия 17-го типа (РЭЭ17) является доминантным наследственным заболеванием, вызванным мутациями в гене *GNAO1*. Белок GNAO1 является альфа-субъединицей комплекса G-белков и участвует в передаче сигнала от G-связанных-рецепторов (GPCR), однако точные молекулярные и генные мишени GNAO1 не известны. На данный момент РЭЭ17 является неизлечимым заболеванием, с высокой частотой приводящим к гибели пациента. Поэтому особый интерес представляет создание клеточной модели, максимально близко воспроизводящей процессы, происходящие в мозге пациента.

Нами были репрограммированы до плюрипотентного состояния фибробласты пациента с диагностированной РЭЭ17, вызванной гетерозиготной мутацией G607A в гене *GNAO1*. Из полученных культур индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) методом направленной дифференцировки нами были получены функционально-активные ГАМК-ергические нейроны, экспрессирующие GNAO1. Транскриптомный анализ выявил различия в экспрессии генов, вовлеченных в функционирование GPCR и G-белков, между нейронами “РЭЭ17” и нейронами, дифференцированных из ИПСК здоровых доноров.

Особый интерес представляет точное время проявления эффектов от мутации в гене *GNAO1* на клетки пациента, так как от этого зависит, в том числе, и временные рамки потенциальной терапии. Так, в коллаборации с использованием полученной нами клеточной модели было показано, что при мутации в гене *GNAO1* нарушено формирование нейрональных розеток, что *in vitro* соответствует стадии нервного гребня в эмбриогенезе. Нами также было показано изменение локализации белка GNAO1 при дифференцировке. Так, в ИПСК белок GNAO1 находится в ядре, в то время как в нейронах он локализуется в клеточной мембране. Это, по нашему мнению, может свидетельствовать о различных функциях GNAO1 на разных стадиях развития организма. Интересно, что белок GNAO1 существует в виде двух основных изоформ, которые отличаются только несколькими аминокислотами, входящими в состав внешней альфа-спирали. Нами была выдвинута гипотеза об их функциональном различии. Для проверки этой гипотезы мы создали ряд лентивирусных векторов, экспрессирующих различные изоформы GNAO1 как в мутантном, так и нормальном состоянии, а также слитые с белковым тегом или репортерным флуоресцентным белком.

Нами на основе ИПСК была создана клеточная модель, позволяющая изучать молекулярный патогенез РЭЭ17 и тестировать потенциальные терапевтические агенты. При помощи созданной модели показано, что мутации в гене *GNAO1* начинают проявляться уже в раннем нейрогенезе. Точные молекулярные механизмы патогенеза РЭЭ17, однако, требуют дальнейшего изучения.

ДИФФЕРЕНЦИРУЕМ ДИАГНОЗ: ДИАБЕТИЧЕСКАЯ НЕЙРООСТЕОАРТРОПАТИЯ ШАРКО И ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИЕ ПОРАЖЕНИЯ СТОП ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Галкина Н.В., Хорошилова Я., Русакова Т.А.

Отделение эндокринологии с Центром диабетической стопы ФМБА России

По данным Международной федерации диабета каждый десятый взрослый в мире страдает сахарным диабетом (537 миллионов человек), 1 из 2 случаев сахарного диабета у взрослых остается недиагностированным (240 миллионов человек), 1 из 9 взрослых имеет нарушение толерантности к глюкозе (541 миллионов человек), 1 из 18 – нарушение гликемии натощак (319 миллионов человек) – предиабет. Диабетическая нейроостеоартропатия (ДНОАП Шарко) – относительно безболевая, прогрессирующая, деструктивная артропатия одного или нескольких суставов, сопровождающаяся неврологическим дефицитом, была впервые описана Ж-М Шарко XIX веке. Нейропатически пораженный сустав был результатом сифилитической спинной сухотки (*tabes dorsalis*). В настоящее время главная причина – сочетание диабетической нейропатии (соматической и вегетативной) и травматизации и/или хирургического вмешательства в пределах стопы. К группам риска по развитию ДНОАП Шарко относятся длительно болеющие диабетом пациенты, с периферической нейропатией любого генеза, перенесшие хирургические вмешательства на стопе, получающие лечение ГКС, иммуносупрессорами, больные на заместительной почечной терапии. При внешней травме, операции возникает цитокиновый шок, ведущий к развитию ДНОАП за счет активации провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β), RANK-L, NF- κ B, остеокластогенеза и резорбции кости. При установке диагноза ДНОАП важно исключить такие состояния, как тромбоз глубоких вен (необходимо выполнение УЗДГ вен нижних конечностей), рожистое воспаление (системные признаки воспалительной реакции: повышение температуры тела, лейкоцитоз, повышение уровня С-реактивного белка), флегмону (системные признаки воспалительной реакции, при УЗИ мягких тканей – характерные признаки, местные признаки - флюктуация), остеомиелит костей стопы, артрит, негнойные поражения кости при СД: остеопороз костей стоп, параоссальное костеобразование без признаков ДНОАП, очаговый остеолитизис, нейропатические (маршевые) переломы, спонтанные подвывихи и вывихи), недиабетические заболевания костей (асептический некроз кости при тромбозе питающих сосудов, остеохондропатия и др.) При остеомиелите в отличие от ДНОАП будут наблюдаться системные признаки воспалительной реакции, наличие свищевого хода (раневой дефект, сообщающийся с костными структурами), «золотой стандарт» диагностики остеомиелита – биопсия костной ткани, сцинтиграфия с мечеными лейкоцитами.

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕЗА РЕСТРИКТИВНОЙ КАРДИОМИОПАТИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЕЙ ГЕНА ФИЛАМИНА С (*FLNC*), В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ИПСК ЧЕЛОВЕКА

Голиусова Д.В., Шарикова М.Ю., Лаврентьева К.А., Емец Е.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А.,

Лебедева О.С.

Лаборатория клеточной биологии

Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) – это орфанная патология сердца, характеризующаяся рестриктивным типом кровенаполнения желудочков ввиду повышения жесткости и снижения пластичности миокарда. Наиболее тяжелые наследственные формы заболевания манифестируют в раннем детском возрасте (до 5 лет) и характеризуются плохим прогнозом выживаемости с необходимостью трансплантации сердца. Одним из недавно выявленных генов, ассоциированных с развитием РКМП, оказался ген высококонсервативного актин-связывающего белка филамина С – ген *FLNC*, который расположен на длинном плече 7-й хромосомы человека. Филамин С экспрессируется преимущественно в поперечно-полосатых скелетных и сердечных мышечных клетках, он входит в состав Z-дисков и вставочных дисков саркомеров. Филамин С обеспечивает организацию и стабилизацию трёхмерной сети тонких нитей актина, а также выполняет механо-сенсорную и сигнальную функции, реагируя на механические стимулы и взаимодействуя с многочисленными белками-партнерами. Большинство описанных гетерозиготных миссенс-вариантов *FLNC* предположительно нарушают конформацию белка и приводят к его агрегации в саркомерах с нарушением протеостаза клеток. Также описаны loss-of-function варианты, приводящие к гаплонедостаточности с дезинтеграцией миофибрилл саркомеров. В настоящее время тонкие молекулярно-генетические механизмы развития РКМП до сих пор остаются малоизученными.

Целью данной работы является поиск и изучение проявлений на клеточном уровне РКМП, ассоциированной с гетерозиготной делецией трёх нуклеотидов в 45-м экзоне гена *FLNC* (с.7416-7418delGAA). Для этого мы используем кардиомиоциты, дифференцированные *in vitro* из ИПСК (ИПСК-КМ) пациента с диагнозом педиатрическая РКМП и исследуемой мутацией. На первом этапе работы мы провели анализ соотношения экспрессии аллелей *FLNC^{WT}* и *FLNC^{MUT}* в ИПСК-КМ пациента для оценки наличия гаплонедостаточности на уровне мРНК. Детекцию аллелей проводили методом RT-qPCR с использованием аллель-специфичных флуоресцентных зондов типа TaqMan. Также мы проанализировали тканеспецифичность экспрессии аллеля дикого типа *FLNC^{WT}* в 3 типах дифференцированных производных линий ИПСК пациента – фибробластоподобных клетках, нейтральных клетках-предшественниках и клетках дефинитивной энтодермы. Мы показали, что в дифференцированных клетках пациента не наблюдается сдвига экспрессии гена *FLNC* в сторону какого-либо из аллелей.

На втором этапе работы мы поставили задачу разработки протокола созревания ИПСК-КМ *in vitro* для дальнейшего сравнительного анализа соотношения экспрессии аллелей *FLNC^{WT}/FLNC^{MUT}*, поскольку проанализированные нами в данной работе ИПСК-КМ больше соответствуют фетальным, нежели взрослым кардиомиоцитам, и могут не отражать фенотип патологии. Кроме того, мы подобрали и протестировали генетические конструкции для редактирования исследуемой делеции гена *FLNC* в ИПСК пациента и её внесения в ИПСК неродственного здорового донора методом праймированного редактирования для получения изогенных контрольных линий кардиомиоцитов в дополнение к нашей клеточной модели. В докладе будут представлены полученные нами предварительные результаты.

Работа выполнена при финансировании РФФ, грант № 23-25-00456.

СРАВНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМНЫХ И ПРОТЕОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ ХОНДРОЦИТОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Голубинская П.А.¹, Ручко Е.С.¹, Пикина А.С.¹, Смирнов И.П.²,
Климина К.М.³, Гордеева В.Д.⁴, Арапиди Г.П.⁴, Еремеев А.В.¹

¹ Лаборатория трансляционной биомедицины

² Лаборатория структуры и функций биополимеров

³ Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии

⁴ Лаборатория системной биологии

Развитие технологий с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) открывает перед исследователями новые возможности в области регенеративной медицины [1]. В работах, посвященных задаче восстановления структуры гиалинового хряща – ткани, характеризующейся слабым регенеративным потенциалом, применение ИПСК для получения хондроцитоподобных производных является перспективным способом улучшения или замены существующих методик восстановления ткани при различных паталогических состояниях, например, травмах или артритах различного генеза [2]. Однако, современные протоколы дифференцировки ИПСК в клетки, подобные хондроцитам, являются несовершенными, что ведет к необходимости оптимизации методов с целью увеличения их эффективности, безопасности для дальнейшей применимости при масштабировании.

В данной работе были получены и проанализированы транскриптомные (RNA-seq) и протеомные (LC-MS) профили клеточных культур хондроцитов, выделенных из биоптатов как здоровых доноров, так и пациентов с различными вариантами патологий, а также их 3D клеточных культур – в виде сфероидов. Аналогичные профили были получены для 2D и 3D культур ИПСК и дифференцированных из ИПСК хондроцитоподобных производных.

Было обнаружено, что для нативных хондроцитов, по сравнению с хондроцитоподобными производными ИПСК, характерны повышенные уровни экспрессии генов, участвующих в процессах организации внеклеточного матрикса и метаболизма гликозаминогликанов. При этом наблюдалась пониженная экспрессия генов, вовлеченных в регуляцию пролиферации клеток. При сравнении хондроцитоподобных производных ИПСК с ИПСК было выявлено обогащение путей, вовлеченных в синтез коллагена. При сравнении 2D и 3D культур нативных хондроцитов выявлено увеличение экспрессии генов, регулирующих цикл ГТФаз и снижение экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм глюкозы и углеводов. Для хондроцитов, полученных из биоптатов от пациентов с артрозами, характерна активность генов, регулирующих клеточный цикл и генов, участвующих в организации ВКМ, синтез и деградацию коллагена.

Полученный массив омиксных данных о хондроцитах различного происхождения и хондроцитоподобных производных ИПСК позволяет выделить ключевые сигнальные пути, что может быть использовано при оптимизации протоколов направленной дифференцировки.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-15-00250.

ЛИТЕРАТУРА

1. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. Vol. 126. P. 663–676.
2. Craft A., Rockel J., Nartiss Y., Kandel R., Alman B., Keller G. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells // Nat Biotechnol. 2015. Vol. 33. P. 638–645.

РАЗРАБОТКА И ПИЛОТНОЕ ВНЕДРЕНИЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРЕЦИЗИОННОЙ ОНКОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ “ЭКЗОМ.РУ”

Горбачев А.Ю.^{1,2}, Попов С.А.², Трусов Н.В.^{1,3}, Уразаева Д.Р.^{1,4}, Авшалумов А.С.^{1,4}, Семенов А.А.^{1,4},
Михайлычева М.В.^{1,4}, Бабанина М.В.^{1,4}, Рябинкин Е.Д.¹, Кулемин Н.А.⁵, Федюшкина И.В.⁵, Мещеряков
А.А.⁶, Лазарев В.Н.^{4,7}

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

²ООО “Институт Геномного Анализа”

³Лаборатория энзимологии питания ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

⁴Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

⁵Лаборатория генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

⁶Государственная клиника № 123 персональной медицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

⁷Лаборатория геномной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Современная медицина активно использует методы высокопроизводительного секвенирования, особенно в контексте диагностики генетических заболеваний и выборе таргетной терапии для лечения рака.

Несмотря на значительное снижение себестоимости за последнее десятилетие, применение высокопроизводительного секвенирования по-прежнему остается недоступным для большинства пациентов. Высокая стоимость является не единственным ограничением для массового применения данной технологии. Поскольку секвенирование связано с генерацией большого объема информации, актуальной задачей становится разработка стандартизированных, автоматизированных и масштабируемых протоколов для анализа данных. Процесс получения, анализа и клинической интерпретации зачастую разделены между разными участниками медицинского процесса (лаборатория, биоинформатик, врач). Подобное разделение создает необходимость в построении IT-инфраструктуры для безопасного хранения и обмена данными с использованием графических интерфейсов, доступных в формате веб-приложения.

Целью нашей работы было создать прототип платформы для прецизионной медицины, которая включает в себя: (I) оригинальный лабораторный протокол, позволяющий снизить стоимость исследования; (II) автоматизированный биоинформатический конвейер для возможности стандартизированного анализа большого количества образцов нормальной и опухолевой ДНК путем таргетного секвенирования; (III) программное обеспечение для создания персонализированного отчета для подбора таргетной терапии; (IV) облачное-веб приложение с графическим интерфейсом, позволяющее управлять вычислениями, хранить и обмениваться данными высокопроизводительного секвенирования, а также результатами анализа данных.

На основе анализа данных литературы и патентного поиска нами были реконструированы отдельные этапы пробоподготовки ДНК-библиотек, а также подобраны компоненты, необходимые для проведения целевого обогащения при таргетном секвенировании. Сравнение разработанного лабораторного протокола пробоподготовки с коммерческим набором для приготовления экзомных библиотек показало сопоставимые результаты с точки зрения качественных и количественных характеристик. Был разработан и валидирован автоматизированный конвейер, оптимизированный для работы с секвенатором DNBSEQ-G400 (MGI tech. Китай), позволяющий анализировать данные таргетного и полногеномного секвенирования нормальных и опухолевых образцов ДНК. Было разработано программное обеспечение, позволяющее генерировать персонализированные отчеты для врача с динамической структурой в формате pdf. На финальном уровне разработки платформы был реализован полностью функциональный прототип облачного веб-приложения включающий возможность запуска анализа данных, просмотра результатов с возможностью обмена данными с другими зарегистрированными пользователями. Разрабатываемая платформа получила рабочее название Экзом.ру и доступна по адресу: <https://exome.ru/>

Разрабатываемая система находится на стадии пилотного тестирования и внедрения в клиническую практику среди пациентов ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России и контрактных коммерческих организаций.

ФАГОТЕРАПИЯ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Городничев Р.Б.¹, Корниенко М.А.¹, Беспятых Д.А.¹, Малахова М.В.¹, Вesselовский В.А.², Голошапов О.В.³,
Шитиков Е.А.¹

¹Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

²Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии

³ОРИТ №3 НИИ ДОГИТ им.Р.М.Горбачевой

Устойчивые к терапии антибиотиками бактериальные инфекции являются серьезной проблемой для медицины и занимают третье место среди причин смертности в мире. Терапия бактериофагами - перспективная альтернатива антибиотикам в борьбе с такими инфекциями. Целью данного исследования было на ограниченной выборке пациентов оценить эффективность и возможные побочные эффекты фаговой терапии кишечной инфекции, вызванной *K. pneumoniae*.

В течение 2021-2022 годов в ОРИТ №3 была собрана коллекция из 94 штаммов *K. pneumoniae*. Капсульные типы штаммов определяли секвенированием гена *wzi*. Чувствительность штаммов к бактериофагам оценивали методом спот-тестирования. В исследование было включено четыре пациента с различными онкологическими заболеваниями крови и кроветворения, перенесших трансплантацию костного мозга. Критерием отбора пациентов было: подписание информированного согласия; кишечная инфекция, вызванная устойчивыми к стандартной терапии штаммами *K. pneumoniae*; чувствительность штамма к коктейлю бактериофагов в *in vitro* экспериментах; решение лечащего врача о назначении терапии бактериофагами. Коктейль бактериофагов принимался пациентами перорально дважды в день в течение 10 дней. На 0, 3, 6 и 10 дни кал пациентов отбирали для микробиологического исследования. Высев из клинического материала и подсчет титра *K. pneumoniae* осуществляли на уриселект агаре. Для изолированных штаммов *K. pneumoniae* оценивали титр, чувствительность к антибиотикам и коктейлю бактериофагов, а также капсульный тип.

Штаммы относились к 24 капсульным типам, однако 66% принадлежали всего к 5 (KL2, KL28, KL64, KL102, KL107). По результатам был подобран коктейль из 6 бактериофагов: 5 фагов, специфичных в отношении самых распространенных капсульных типов, и один фаг широкого спектра действия. У трех пациентов наблюдался высокий (10^7 - 10^8 КОЕ/мл) титр *K. pneumoniae* на протяжении всего периода наблюдений. В ходе анализа было определено, что после третьего дня у данных пациентов произошла смена штаммов на нечувствительные к бактериофагам коктейля и имеющим другие капсульные типы (KL3 или KL41). У последнего пациента до 6 дня высевалась чувствительная к бактериофагам *K. pneumoniae* в высоком титре 10^8 КОЕ/мл, в дальнейшем *K. pneumoniae* была полностью элиминирована и сменилась штаммом *Enterococcus faecium* в титре 10^8 КОЕ/мл. В ходе 10 дней терапии не было выявлено негативных эффектов от применения коктейля бактериофагов. Учитывая, что к десятому дню терапии у всех пациентов произошла элиминация исходного штамма, а также не было выявлено заметных побочных эффектов, результаты фаготерапии были признаны успешными.

ИММУННЫЙ ФЕНОТИП АСТРОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИПСК ПАЦИЕНТОВ СО СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИЕЙ 17 ТИПА

Давиденко А.В.¹, Механцева Е.В.¹, Климина К.М.², Султанов Р.И.³, Богомазова А.Н.^{1,4}, Лагарькова М.А.¹.

1 – Лаборатория клеточной биологии; 2 – Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии; 3 – Лаборатория системной биологии; 4 – Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины.

Все лаборатории – ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина.

Спиноцеребеллярная атаксия 17 типа (SCA17) – это наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением значительной части головного мозга, тяжёлыми симптомами и необратимым прогрессированием. Причиной SCA17 является мутация экспансии тринуклеотидных CAG-повторов в кодирующей части гена *TBP*. Механизмы развития заболевания изучены плохо, но считается, что в патогенезе SCA17 задействовано несколько различных факторов, одним из которых предположительно является нейровоспаление. Характерным признаком воспалительного процесса в головном мозге является появление реактивных астроцитов, патологически изменённых клеток, отличающихся в том числе повышенной продукцией провоспалительных факторов.

Целью данной работы было исследование иммунного фенотипа астроцитов, несущих мутацию экспансии тринуклеотидных CAG-повторов в гене *TBP*. В работе мы использовали полученные ранее ИПСК пациентов со SCA17 и ИПСК здоровых доноров. ИПСК дифференцировали в астроглиальном направлении, полученные дифференцированные клетки характеризовали путём иммуноокрашивания на маркеры астроцитов S100b и GFAP.

В астроглиальных клетках SCA17 мы наблюдали более высокий уровень экспрессии провоспалительного цитокина TNF. На обработку экзогенным TNF астроглиальные клетки SCA17 отвечают дополнительным повышением экспрессии гена *TNF*, однако это повышение менее выражено, чем в здоровом контроле. Астроциты SCA17 не демонстрируют повышенной чувствительности к низким концентрациям TNF, что свидетельствует в пользу того, что их активированное состояние не связано со способностью реагировать на более низкие пороговые стимулы. После удаления экзогенного TNF из культуральной среды клетки SCA17 сохраняют повышенный относительно интактных клеток уровень экспрессии *TNF*. Транскриптомный анализ полученных клеток подтвердил, что в астроцитах SCA17 по сравнению с контролем наблюдается повышенная экспрессия ряда генов, относящихся к иммунному ответу (GO:0019221; GO:0034612).

Таким образом, мы показали, что астроциты SCA17 демонстрируют признаки иммунной активации и склонность к поддержанию хронического вялотекущего воспаления, что говорит о том, что воспалительный процесс может быть одним из механизмов патогенеза SCA17.

Работа финансировалась из средств гранта Министерства науки и высшего образования № 075–15-2019–1669.

ОЦЕНКА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА ТКАНЕЙВОЙ ИНЖЕНЕРИИ НА ОСНОВЕ ХОНДРОЦИТАРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИПСК ПРИ ПОДКОЖНОМ ВВЕДЕНИИ ИММУНОДЕФИЦИТНЫМ МЫШАМ

А.В. Еремеев, П.А. Голубинская, А.С. Пикина, Е.С. Ручко
Лаборатория трансляционной биомедицины

К текущему моменту в России отсутствуют технологии, направленные на патогенетическое лечение повреждений ткани суставного хряща. Основным терапевтическим подходом являются противовоспалительные средства, препараты гиалуроновой кислоты и аутологичной тромбоцитарной массы, которые снимают симптомы и дают небольшую отсрочку для эндопротезирования. Использование 3D-хрящеподобных конструкторов из хондроцитов и ИПСК-производных является перспективным направлением для коррекции глубоких дефектов хрящевой ткани. В рамках доклинических исследований подобных препаратов тканевой инженерии (ПТИ) должны быть оценены биораспределение, характеризующее миграционный потенциал клеток, а также способность образовывать эктопическую хрящевую ткань [1, 2].

Цель данной работы: изучение биораспределения с оценкой состоятельности имплантата с помощью гистологического анализа. Данный имплантат в виде Хондросфер предназначен для лечения поражений суставного гиалинового хряща человека.

Мышей линии Balb/c Nude обоих полов разделили на две опытные группы (инокуляция Хондросфер из хондроцитов человека, из производных ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении) и контрольную группу (плацебо). Мышей взвешивали дважды в неделю, значимых различий по весу животных выявлено не было. Каждые 10 дней проводили измерение размеров инокулята – Хондросферы из ИПСК-производных образовывали меньшие по объёму инокуляты. Через 90 дней из эксперимента вывели половину особей контрольной группы, с инокулированными подкожно Хондросферами на основе хондроцитов человека, и из дифференцированных производных ИПСК. Из органов и тканей животных выделяли ДНК с последующим проведением ПЦР анализа на наличие человеческой ДНК, которая была обнаружена только у мышей в месте закола Хондросфер. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии миграции клеток изучаемого ПТИ в другие органы и ткани животных. Гистологическое исследование введенных Хондросфер проводили с помощью окраски гематоксилином и эозином, альциановым синим, трихромом по Маллори и антителами к коллагену I и II типов, аггрекану, SOX9, Ki67. Во всех образцах имплантов были выявлены все указанные маркеры хрящевой ткани.

Проведённое исследование даёт основания оценивать исследуемые образцы ПТИ как безопасные по части биораспределения. При этом интеграция продукта происходит на ранних сроках исследования (90 дней) с сохранением гистологических характеристик хрящевой ткани в зоне имплантации.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-15-00250.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erben R.G., Silva-Lima B., Reischl I., Steinhoff G., et al. White paper on how to go forward with cell-based advanced therapies in Europe // *Tissue Eng Part A*. 2014. Vol. 20. P. 2549–2554.
2. Fickert S, Gerwien P, Helmert B, Schattenberg T, et al. One-Year Clinical and Radiological Results of a Prospective, Investigator-Initiated Trial Examining a Novel, Purely Autologous 3-Dimensional Autologous Chondrocyte Transplantation Product in the Knee // *Cartilage*. 2012. Vol. 3. P. 27–42.

ВЛИЯНИЕ АЛЬБУМИНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИПЕРГЛИКЕМИИ, НА АКТИВНОСТЬ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

Иванов.В.А., Михальчик Е.В., Соколов А.В., Панасенко О.М.

Лаборатория физико-химических методов исследований и анализа

Сахарный диабет второго типа (СД2) вызывает длительную гипергликемию, которая приводит к множеству осложнений, включая нарушение бактерицидной функции врожденного иммунитета [1]. Основной компонент клеточного врожденного иммунитета – нейтрофилы, реализующие свой бактерицидный потенциал преимущественно через образование активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ). Ключевую роль играют АФГ, образование которых катализирует фермент азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидаза (МПО). АФГ, обладая повышенной реакционной способностью, модифицируют биомолекулы, клетки и ткани, что приводит к развитию галогенирующего стресса – состояния, при котором продукция АФГ превышает возможности организма по их утилизации. Галогенирующий стресс является отягчающим фактором при развитии многих патологий, ассоциированных с воспалением, в том числе и СД2. Однако до сих пор не ясно, как функционирует МПО в условиях гипергликемии.

Целью исследования было изучение особенностей функционирования МПО, ключевого фермента, обеспечивающего бактерицидную функцию нейтрофилов, в условиях моделирования гипергликемии.

Гипергликемию моделировали путём повышения концентрации глюкозы, добавления глиоксаля или метилглиоксаля, являющихся продуктами неферментативного окисления глюкозы, а также основного белка плазмы крови – человеческого сывороточного альбумина, предварительно модифицированного метилглиоксалем (ЧСА-МГ).

Глюкоза не оказывала значимого влияния на ферментативную активность МПО независимо от ее концентрации. Метилглиоксаль дозозависимо снижал ферментативную активность МПО в концентрациях, значительно превышающих физиологические. Методом диск-электрофореза было показано, что ЧСА-МГ связывается с МПО, образуя прочный комплекс ($K_d = 1,1$ нМ), что приводит к достоверному снижению как пероксидазной, так и хлорирующей активности МПО. Данный результат был косвенно подтвержден экспериментами, проведенными в условиях *ex vivo*. Добавление в кровь ЧСА-МГ через 3 ч инкубации приводило к достоверному снижению уровня хлорированного белка, а также самой МПО. В то же время, высокие концентрации глюкозы, метилглиоксаля, нативного ЧСА не оказывали значимого влияния на содержание МПО и хлорированных белков в крови.

Таким образом, показано что ЧСА-МГ связываясь с МПО приводит к снижению её ферментативной активности, препятствуя продукции АФГ и развитию галогенирующего стресса при гипергликемии.

Результаты, представленные в докладе, вошли в публикацию: Panasenko O.M.; Ivanov V.A.; Mikhailchik E.V. et al. Methylglyoxal-modified human serum albumin binds to leukocyte myeloperoxidase and inhibits its enzymatic activity. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2263. <https://doi.org/10.3390/antiox11112263>

Список литературы:

1. Collison, K.S.; Parhar, R.S.; Saleh, S.S.; Meyer, B.F.; Kwaasi, A.A.; Hammami, M.M.; Schmidt, A.M.; Stern, D.M.; Al-Mohanna, F.A. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J. Leukoc. Biol.* 2002, *71*, 433-444.

АССОЦИАЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА С ПЕРВИЧНЫМ СКЛЕРОЗИРУЮЩИМ ХОЛАНГИТОМ: ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

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

Отделение гастроэнтерологии

Первичный склерозирующий холангит (ПСХ) – хроническое холестатическое заболевание печени неустановленной этиологии, характеризующееся негнойным деструктивным воспалением, облитерирующим фиброзом и сегментарной дилатацией внутри- и/или внепеченочных желчных протоков. Существует более 3000 возможных фенотипов ПСХ, особенное место из них занимает фенотип ПСХ, ассоциированный с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК). Частота сочетания ПСХ с ВЗК достигает 50-80%, такая категория пациентов является одной из самых сложных и требует особенных подходов в их ведении. Дебют ПСХ в сочетании с ВЗК более в раннем возрасте в отличие от моноварианта ПСХ (в среднем - $30,6 \pm 17,0$ лет). Особенности ВЗК при ПСХ является скрытое бессимптомное течение с преобладанием поражения правых отделов толстой кишки и ретроградным илеитом. Следует помнить, что у 89% пациентов с ПСХ без эндоскопических признаков ВЗК при морфологическом исследовании биоптатов кишечника выявлено хроническое воспаление. Учитывая данный факт, мы имеем возможность раннего назначения противовоспалительной терапии до манифестации ВЗК. Основным лабораторным предиктором развития ВЗК при исходном ПСХ является повышение щелочной фосфатазы (ЩФ) более 2,95 норм. Различия в генетических ассоциациях при полногеномных исследованиях предполагают, что ПСХ/ВЗК представляют другое заболевание, чем ВЗК, так как только 5% из 200 локусов, идентифицированных при ВЗК, связаны с ПСХ. Микробиота у пациентов с ПСХ/ВЗК имеет отчетливо другой паттерн по сравнению с пациентами ВЗК. При сочетании ВЗК и ПСХ отмечается более высокий риск развития дисплазии и колоректального рака, чем при язвенном колите (ЯК), что требует более тщательного эндоскопического мониторинга. Пациенты ПСХ/ВЗК ведутся согласно клиническим рекомендациям по ВЗК. Требуется постоянный прием препарата урсодезоксихолевой кислоты (УДХК) в дозах от 13 до 20 мг/кг в сутки. Пациенты должны наблюдаться совместно с врачом-трансплантологом, следует помнить об особых показаниях к трансплантации печени при ПСХ: рефрактерный к терапии изнуряющий кожный зуд, частые бактериальные холангиты и холангиокарцинома на ранних стадиях (диаметр менее 3 см без метастазирования). В настоящее время из 64 пациентов с ВЗК, получающих биологическую терапию трое (4,7%) пациенты с ВЗК/ПСХ, из них ЯК – 2 (67%), болезнь Крона(БК) -1 (33%), все мужчины. Средний возраст $44,7 \pm 13,0$ года. Средний возраст дебюта заболевания $30,3 \pm 9,2$ года. ЯК у обоих пациентов характеризуется тотальным поражением толстой кишки, БК – форма илеоколита. Всем пациентам 2 раз в год проводится полное обследование. Пациент с ЯК 58 лет получает биологическую терапию антиинтегриновым препаратом (ведолизумаб) во второй линии с достижением начальной клинической ремиссии с положительной эндоскопической динамикой. У пациента с ЯК 33 лет потребовалась смена с последующей эскалацией частоты введения биологического препарата ингибитора интерлейкинов 12 и 23 (вторая линия), достигается положительный клинический и, в меньшей степени, эндоскопический ответ. Оба пациента постоянно получают препараты УДХК с положительным лабораторным эффектом. В настоящее время 44-летний пациент с БК обсуждается с трансплантологом по поводу постановки в лист ожидания трансплантации печени, у него сохраняется малая активность воспалительного процесса в толстой кишке, подвздошная кишка интактна, постоянно принимает месалазин, от проведения биологической терапии отказался ввиду организационных причин. Таким образом, пациенты ВЗК/ПСХ являются особой группой, требующей более тщательного мониторинга, комбинированной терапии и мультидисциплинарного подхода.

ПСЕВДОУЗЕЛ В ГЕНОМЕ SARS-COV-2 КАК МИШЕНЬ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АГЕНТОВ

Книжник Е.К., Павлова Ю.И., Светлова Ю.И., Аралов А.В., Варижук А.М.

Лаборатория структуры и функций биополимеров ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Псевдоузлы – консервативные структуры геномной РНК ряда ретро- и коронавируса. В простейшем случае псевдоузел представляет собой комбинацию двух взаимопересекающихся шпилечных фрагментов, стебли которых неравноценны по термодинамической устойчивости. В геноме SARS-CoV-2 подобная структура расположена вблизи сайта проскальзывания рибосомы и обеспечивает программируемый -1 сдвиг рамки считывания в процессе трансляции, запуская синтез полипептида – предшественника RdRp и других критически важных неструктурных белков [1]. Поскольку расплетение псевдоузла должно остановить репликацию вируса [2], актуальной задачей является дизайн эффективных расплетающих агентов [3].

В представленной работе в качестве таких агентов были предложены аналоги олигонуклеотидов (ОДН). Они комплементарны одной из цепей псевдоузлового стебля и вытесняют другую цепь ввиду более прочного связывания с мишенью за счет модификаций нуклеиновых оснований и остова. Принципиальное отличие ОДН, адресованных к псевдоузлу, от прочих антисмысловых олигонуклеотидов состоит в следующем: они не только блокируют уже скопированную РНК вируса (например, активируя РНКазу H), но и предотвращают само копирование. Новизна работы обусловлена рациональным выбором стерически доступной мишени ОДН – фрагмента наименее устойчивого стебля. Это слабое звено в структуре псевдоузла определяли на основании опубликованных результатов *in vitro* экспериментов с молекулярными пинцетами [4].

Используя электрофоретические и оптические методы, мы продемонстрировали расплетение псевдоузла аналогами ОДН *in tube*. С помощью конструкции с двумя репортерными генами (генами люциферазы), разделенными вирусным сайтом проскальзывания рибосомы и псевдоузлом, было доказано ингибирование сдвига рамки считывания в присутствии ОДН в клетках линии HEK-293T. На двух клеточных линиях со стабильной экспрессией ACE2-рецептора по результатам оценки цитопатического эффекта было установлено ингибирование репликации SARS-CoV-2 аналогами ОДН в субтоксической концентрации. В дальнейшем возможно рассмотрение полученных ОДН в качестве активного компонента препаратов против коронавирусной инфекции.

Список литературы:

[1] - Bhatt, P.R. et al. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science* 2021, doi: 10.1126/science.abf3546

[2] - Kelly, J.A.; Woodside, M.T.; Dinman, J.D. Programmed -1 Ribosomal Frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target. *Virology* 2021, doi: 10.1016/j.virol.2020.12.010

[3] - Zhang, K. et al. Cryo-EM and antisense targeting of the 28-kDa frameshift stimulation element from the SARS-CoV-2 RNA genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021, doi: 10.1038/s41594-021-00653-y

[4] - Neupane, K. et al. Structural dynamics of single SARS-CoV-2 pseudoknot molecules reveal topologically distinct conformers. *Nat. Commun.* 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25085-6

ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ХРЯЦА И ГЛАЗА ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Лагарькова М.А., Еремеев А.В., Лебедева О.С., Сурдина А.В., Богомазова А.Н.

Лаборатория клеточной биологии,
Лаборатория трансляционной биомедицины

Хронические заболевания суставов представляют серьезную медицинскую и социальную проблему. Разрушение и затрудненное естественное восстановление структуры гиалинового хряща во многом определяется тем, что это аваскулярная соединительная ткань с пониженным регенеративным потенциалом.

В свою очередь, дегенерация пигментного эпителия является первопричиной многих заболеваний сетчатки глаза.

Многообещающим подходом для решения этих проблем является применение клеточных технологий с использованием как аутологичного материала, так и культур индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК).

Для дифференцировки оптимальным представляется получение 3D органоидов, т.к. трехмерные структуры наиболее точно имитируют события раннего эмбриогенеза.

В данной работе нами были получены первичные культуры хондроцитов как от здоровых пациентов, так и от пациентов с заболеваниями суставов. Также мы показали способность полученной культуры хондроцитов к формированию 3D органоидов с помощью микролуночных планшетов Aggrewell. Был показан высокий уровень экспрессии агреккана, что указывает на формирование гиалинового хряща.

Кроме того, нами был разработан протокол дифференцировки ИПСК, который позволяет получить биоэквиваленты хряща со смешанным фенотипом, сочетающим характеристики как гиалиновой, так и волокнистой хрящевой ткани, что соответствует незрелой ткани ранних стадий хондрогенеза.

Несмотря на преимущества, связанные с производством клеточных продуктов на основе аллогенных производных ИПСК, проблема гистосовместимости донора и реципиента остается нерешенной. Перспективным способом уменьшить отторжение аллотрансплантата могут стать модифицированные ИПСК с пониженной иммуногенностью, производные которых будут подходить любому реципиенту.

Для этого нами была получена и охарактеризована линия ДИПСК с пониженной иммуногенностью, нокаутная по гену бетта-2-микроглобулина *B2M*, поскольку именно *B2M* важен для поддержания конформации тяжелой цепи и необходим для экспрессии всех молекул МНС класса I. Отсутствие молекул МНС класса I делает аллогенную клетку практически неузнаваемой для цитотоксических Т лимфоцитов.

Данная линия ДИПСК с нокаутом гена *B2M* была получена нами с помощью метода геномного редактирования CRISPR/Cas9. Полученная линия несет гетерозиготную делецию в гене *B2M*, полностью соответствует критериям плюрипотентности и может быть использована для создания 3D-органоеидов с пониженной иммуногенностью.

Работа выполнена в рамках Государственного задания «Органоид-22», номер государственного учета НИОКТР 122032300191-2.

ИНДЕКС ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОРГАНОИДОВ МОЗГА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬЮ.

Лебедева О.С., Еремеев А.В.

Лаборатория клеточной биологии,
Лаборатория трансляционной биомедицины

Модели *in vitro* активно применяются для изучения патоморфогенеза заболеваний. Современным вариантом такой модели являются органоиды (кластеры клеток с высоким содержанием дефинитивных клеточных форм и органоподобной структурой), полученные в результате 3D культивирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Использование технологии индуцированной плюрипотентности и метода 3D культивирования даёт возможность избегать высокоинвазивных, травматичных биопсий для получения клеток нужного типа и воспроизводить элементы гистогенеза в объёме, способствуя формированию органоспецифической клеточной архитектоники, что особенно актуально для изучения заболеваний хрящевой ткани.

Целью исследования являлась оценка индекса пролиферативной активности хондросфер в областях паттернов хондрогенеза, а также интерпретация полученных результатов.

Выделенные от доноров с заболеваниями хрящевой ткани (артрозы) индуцированные плюрипотентные стволовые клетки культивировали с получением хондросфер. Органоиды, зафиксированные в формалине, после проводки и заливки в парафин, микромировали и подвергали морфологическому исследованию с применением окраски гематоксилин-эозин, а также использовали иммуногистохимическую методику окраски на Ki67 для подсчёта индекса пролиферативной активности (ИПА).

При морфологическом исследовании во всех органоидах были обнаружены участки незрелых предшественников хондроцитов - характерный элемент раннего периода хондрогенеза. При оценке распределения Ki67+ клеток было выявлено, что в органоидах, полученных от пациентов с артрозами, наблюдается высокая пролиферативная активность в данных участках (от $Ki67_i=37,03\pm 12,7\%$ до $90,83\pm 3,24\%$). Вне перечисленных зон, диффузно, сохраняется низкий уровень пролиферации клеток ($Ki67_i=9,3\pm 4,78\%$).

Полученные результаты свидетельствуют об успешной хондрогенной дифференцировке пациент-специфичных индуцированных стволовых клеток. Органоиды, полученные от больных с патологией хрящевой ткани, характеризуются отличными друг от друга паттернами распределения пролиферирующих клеток, что, вероятно, связано с особенностями нарушения физиологических процессов при указанной нозологии.

Работа выполнена в рамках Государственного задания «Органоид-22», номер государственного учета НИОКТР 122032300191-2.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА: ПОИСК ОПТИМАЛЬНЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ

Лузанова В.Д.¹, Силантьев А.С.¹, Кардонский Д.А.¹, Конанов Д.Н.², Воробьева Е.А.¹, Шагалеева О.Ю.¹,
Кашатникова Д.А.¹, Калачнюк Т.Н.³, Белоусова Е.А.⁴, Корсунский Е.С.⁴, Захаржевская Н.Б.¹

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

²Лаборатория математической биологии и биоинформатики НИИ СБМ Роспотребнадзора

³Отделение гастроэнтерологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

⁴Отделение гастроэнтерологии ГБУЗ МО МОНКИ им. М. Ф. Владимирского

Введение: Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), являющиеся одной из актуальных проблем современной гастроэнтерологии, в основном представлены двумя вариантами патологий: неспецифический язвенный колит (НЯК) и болезнь Крона (БК). Однако, в большинстве случаев точная дифференциальная диагностика возможна лишь на поздних стадиях течения заболевания, с учетом наличия патогномичных признаков, характеризующих каждую из указанных патологий. Методы молекулярной диагностики могут способствовать раннему выявлению заболеваний, однако приоритетным является поиск удачной комбинации маркеров, а также методического решения, которое позволит проводить расширенный скрининг пациентов для своевременного выявления ВЗК. Трудности в интерпретации получаемых результатов возникают как на уровне пробоподготовки, так и поиска оптимального вычислительного решения. В данной работе проводится комплексное сравнение метаболомных данных, полученных для свежесобранных и длительно хранящихся образцов пациентов с ВЗК методами ВЭЖХ-МС и ГХ-МС с парофазным способом экстракции.

Материалы и методы: Исследование проводилось для групп пациентов с верифицированным диагнозом болезнь Крона и язвенный колит. От пациентов в условиях стационара были получены биологические материалы сыворотки крови и стула. Образцы сыворотки и стула (длительного хранения образцы - ДО), собранные в отделении гастроэнтерологии ФГБУ ФНКЦ, были получены от 120 пациентов с БК и ЯК, а также 64 образца контрольной группы. Свежесобранные образцы (СО), полученные от 40 пациентов с БК и ЯК, а также 50 образцов контроля, были предоставлены отделением гастроэнтерологии ГБУЗ МО МОНКИ им. М. Ф. Владимирского. Липидомный анализ сыворотки проводился ВЭЖХ-МС с использованием Sciex 6600 QTOF; для таргетного метаболомного анализа сыворотки методом ВЭЖХ-МС был применен Sciex 4500 QTRAP. Образцы стула анализировали посредством ГХ/МС Shimadzu QP2010 Ultra с парофазным экстрактором Shimadzu HS-20.

Результаты: В ходе анализа данных, полученных методом ГХ-МС для образцов стула ДО и СО, были получены идентичные варианты метаболомных отличий. Так, было показано, что изовалериановая кислота является одним из маркеров развития ВЗК, а соотношение валерианой и изовалериановых кислот посредством метода логистической регрессии позволяет получить коэффициент риска развития ВЗК. В ходе анализа данных, полученных методом ВЭЖХ-МС для образцов сыворотки крови ДО, были выявлены существенные отличия в представленности большинства метаболитов, что характеризовало методику, как уникальный способ неинвазивного выявления ВЗК. Однако, при проверке метода на СО были выявлены минимальные отличия в представленности ряда аминокислот в образцах с ВЗК в отличие от группы контроля. Тем не менее, метод можно рассматривать, как вариант выбора при проведении малоинвазивной диагностики ВЗК.

Выводы: Метод ГХ-МС с парофазным способом экстракции демонстрирует стабильный результат выявляемых отличий как для длительно хранящихся образцов стула, так и для свежесобранных. Метод ВЭЖХ-МС требует дополнительной оптимизации в отношении образцов сыворотки крови, как в части пробоподготовки, так и отбора наиболее стабильных метаболитов.

НОВЫЙ БЕЛОК-АНТИКОАГУЛЯНТ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

Манувера В.А., Харлампиева Д.Д., Бобровский П.А., Графская Е.Н, Бровина К.А., Лазарев В.Н.

Лаборатория генной инженерии.

Слюна медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*), как и слюна других видов пиявок содержит в себе различные антикоагулянты. Антикоагулянты предотвращают свертывание крови в процессе питания пиявки. Некоторые антикоагулянты широко известны, например, гирудин. Другие известны давно, но менее изучены, как, например, антистазин или саратин. Однако, есть основания предполагать, что далеко не все антикоагулянты пиявок уже обнаружены и описаны. Ранее мы провели комплексное исследование генома, транскриптома и протеома трех близких видов пиявок — *H. medicinalis*, *H. verbana* и *H. Orientalis* (Бабенко и др., 2020). В результате было обнаружено значительное количество гипотетических пептидов, некоторые из которых имели гомологию первичной структуры с уже описанными антикоагулянтами. Мы отобрали 15 новых потенциальных пептидов-антикоагулянтов, клонировали кодирующую их кДНК и получили рекомбинантные белки. Из всех кандидатов в результате отсева остался только один, но он показал очень высокую активность в тестах *in vitro*. Мы назвали полученный белок CRA (cysteine-rich anticoagulant).

CRA представляет собой малый белок длиной 162 ао, из которых 23 остатка приходится на цистеины. В аминокислотной последовательности четко выявляется сигнальный пептид длиной 23 а.о. Зрелый белок после отщепления сигнального пептида имеет длину 139 а.о. и содержит 22 остатка Cys, что составляет 16 % от общего числа. Расчетные молекулярные массы про- и зрелой формы 18,4 кДа и 15,9 кДа соответственно. Поиск по базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) показывает, что самым близким из описанных гомологов CRA является антистазин (UniProt ID: P15358, PDB ID: 1SKZ) Мексиканской пиявки (*Haementeria officinalis*). Антистазин (ATS) и CRA имеют 39 идентичных аминокислотных остатков. Таким образом, можно уверенно предполагать, что они являются паралогами, но эволюционно разошлись давно, что соответствует ареалам обитания двух пиявок, находящимся на разных континентах. При этом оба белка имеют характерный паттерн распределения остатков цистеина.

Далее, мы проводили тесты АЧТВ с добавлением различных концентраций CRA. Мы установили, что при одинаковых молярных концентрациях CRA ингибирует сворачивание намного сильнее, чем гирудин. Кроме того, мы провели клотинговый тест на ингибирование тромбина. Реакционная смесь содержала фибриноген, зрелый тромбин и исследуемый образец. В этом тесте ситуация оказалась обратной, гирудин ингибировал реакцию эффективнее, чем CRA. Таким образом, можно заключить, что CRA способен напрямую ингибировать тромбин. В то же время, тесты АЧТВ в сравнении с гирудином показывают, что скорее всего CRA способен ингибировать каких-нибудь других участников каскада свертывания, т.к. эффект его действия на внутренний путь свертывания превосходит эффект воздействия только на последнюю стадию.

На основании гомологии CRA и ANS и большого количества остатков цистеина в составе CRA, мы предполагаем наличие у него примерно двух десятков дисульфидных связей. Для косвенного подтверждения наличия дисульфидных связей мы восстановили CRA с помощью меркаптоэтанола и сравнили действие восстановленного и исходного образцов в клотинговом тесте на ингибирование тромбина с использованием в качестве контроля буферного раствора с той же концентрацией меркаптоэтанола (1% vol). В результате оказалось, что после восстановления CRA полностью теряет свои ингибирующие свойства.

Таким образом, мы обнаружили новый антикоагуляционный белок медицинской пиявки. Мы получили рекомбинантный белок в *E. coli* и провели первичный анализ его влияния на гемостаз *in vitro*. Полученные результаты показывают высокий антикоагуляционный потенциал нового белка, который явно заслуживает дальнейшего изучения. Работа поддержана грантом РФФ 23-25-00006.

СИСТЕМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДОГОВРЕМЕННОЙ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ВИРУЛЕНТНЫЙ ФЕНОТИП *ESCHERICHIA COLI*.

Побегуц О.В., Галямина М.А., Авшалумов А. С., Уразаева Д. Р., Михайлычева М. В., Ковальчук С.И.,
Смирнов И.П., Широков Д.А., Иванов В. А., Бабенко В.В., Горбачев А. Ю.

Лаборатория протеомного анализа

Известно, что *E. coli* могут приобретать вирулентные свойства в организме хозяина, благодаря активации экспрессии генов вирулентности факторами окружающей среды, переключая миролюбивый фенотип комменсальных штаммов *E. coli* на агрессивный. При этом такой вирулентный фенотип может сохраняться в течение нескольких поколений, что свидетельствует о долгосрочном переключении эпигенетической памяти. В предыдущих исследованиях нами был обнаружен подобный феномен для изолятов *E. coli*, обладающих адгезивно-инвазивным фенотипом (АИЕС), впервые обнаруженном у пациентов с болезнью Крона. Мы показали, что один и тот же штамм АИЕС можно обратимо переключить в два противоположных по вирулентным свойствам состояния в зависимости от источника углерода: пропионат натрия (ПА) индуцирует формирование вирулентного фенотипа, тогда как глюкоза, наоборот, приводит к резкому снижению вирулентных свойств. При этом подобный феномен не наблюдался для лабораторного штамма K12 Mg1655. Мы получили возможность сравнить изогенные штаммы АИЕС в двух состояниях и изучить механизм такого переключения. В данном исследовании был использован изолят ZvL2, полученный от пациента с болезнью Крона, в качестве контроля - лабораторный штамм Mg1655. Оба штамма были выращены на ПА и глюкозе в качестве единственного источника углерода. Проведена полная сборка геномов в этих двух состояниях. Показано, что пассирование на ПА не приводит к изменениям в геномах, что свидетельствует о эпигенетическом механизме переключения. Сравнительный анализ последовательностей генома, а также анализ метаболического потенциала ZvL2 и Mg1655 выявил наличие альтернативных путей синтеза липополисахаридов (ЛПС) у изолята ZvL2, в частности пути биосинтеза UDP-N-ацетил-L-фукозамина, являющегося предшественником L-фукозамина в составе ЛПС. Отличия в составе ЛПС также были обнаружены при анализе полученного с помощью фенольной экстракции профиля ЛПС. Сравнительный ВЭЖХ-МС анализ протеомов ZvL2 и MG1655, выращенных на ПА и глюкозе, показал, что ZvL2 и MG1655 демонстрирует различный метаболический ответ на ПА, в частности, мы обнаружили, что в отличие от MG1655, для ZvL2 характерна активация метаболизма галактуроновой (ГАЛ) и глюкуроновой кислот. Известно, что гексуронаты могут участвовать в модификации полисахаридного ядра ЛПС, что влияет на вирулентные свойства *E. coli*. Оказалось также, что ГАЛ может выполнять не только роль питательного вещества, но и сигнальной молекулы для колонизации и активации секреции III типа у энтерогеморрагической *E. coli*, регуляцию которого осуществляет транскрипционный фактор EхuR, репрессор ехu регулона, кодирующего ферменты утилизации гексуронатов. Нами был получен мутант ZvL2 с делецией в гене EхuR (ΔехuR). Сравнительный анализ вирулентных свойств дикого типа ZvL2 и мутанта, показал, что ΔехuR теряет способность проникать внутрь эукариотических клеток, а также становится чувствительным к мелиттину. Сравнительный ВЭЖХ-МС анализ протеомов клеток дикого типа и мутанта ΔехuR показал изменения в регуляции синтеза О-антигена у ΔехuR по сравнению с диким типом. Таким образом, показано, что транскрипционный фактор ехuR играет роль в формировании вирулентного фенотипа ZvL2. Предполагается его участие в регуляции структуры ЛПС, что влияет на инвазивные способности ZvL2 и устойчивость к антимикробным пептидам.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ИПСК С НОКАУТОМ ГЕНА *UBE2A*

Секретова Е.К.¹, Хомякова Е.А.¹, Федоренко А.В.¹, Сурдина А.В.¹, Миронов Р.В.¹, Беликова Л.Д.^{1,4},
Воловиков Е.А.^{1,4}, Смирнов И.П.², Побегуц О.В.², Климина К.М.³, Лагарькова М.А.¹, Богомазова А.Н.^{1,4}

1 - Лаборатория клеточной биологии, 2 - Лаборатория протеомного анализа, 3 - Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии. Все три лаборатории – ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина; 4 – Лаборатория онтогенетики Томского НИМЦ.

В 2006 году был описан новый X-сцепленный синдром умственной отсталости по типу Насименто, характеризующийся целым комплексом физиологических нарушений развития центральной нервной системы. Синдром связан с мутациями в гене *UBE2A*, продукт которого является убиквитин-конъюгирующим ферментом E2. На данный момент роль фермента *UBE2A* в нейрогенезе практически не изучена. В нашей лаборатории впервые была получена изогенная система индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), включающая ИПСК с нокаутом гена *UBE2A* и индуцибельной экспрессией гена *UBE2A*. Кроме этого, мы получили линию ИПСК пациента с синдромом Насименто и делецией гена *UBE2A*.

Для изучения молекулярных патогенетических механизмов синдрома Насименто мы дифференцировали полученные линии ИПСК в нейрональные предшественники и клетки глии. Поскольку нарушения развития мозга, в том числе умственная отсталость, зачастую связаны с нарушениями цитоскелета, мы сосредоточились на изучении подвижности производных ИПСК.

Нам удалось показать, что глиальные клетки с нокаутом *UBE2A* характеризуются ускоренной миграцией и усиленной поляризацией в процессе распластывания по сравнению с нормальными клетками и клетками с повышенной экспрессией гена *UBE2A*. Глиальные клетки с нокаутом *UBE2A* также оказались нечувствительными к действию ингибитора ROCK-киназы (Y-27632). В отличие от нормальных клеток, которые без добавления Y-27632 в ростовую среду не способны к распластыванию и формируют многочисленные блебы, клетки с нокаутом *UBE2A* не характеризуются выраженным блеббингом плазматической мембраны, но формируют нормальную ламеллу и способны к эффективной миграции. Такие результаты могут свидетельствовать о сниженной активности Rho-ROCK сигналинга в клетках с нокаутом *UBE2A*, и, следовательно о сниженной актомиозиновой сократимости. Действительно, глиальные клетки с нокаутом гена *UBE2A* практически не формируют выраженных актомиозиновых стресс-фибрилл, а также характеризуются меньшей площадью фокальных контактов. Транскриптомный и протеомный анализы подтверждают наши экспериментальные наблюдения. Так, в линиях с нокаутом или делецией гена *UBE2A* наблюдается значимое снижение экспрессии генов, задействованных в активации ГТФаз Rho (GO:0005096), генов комплекса немышечного миозина II (GO:0016459), активация которого в главной степени определяется ROCK киназой, а также генов, ответственных за организацию актиновых филаментов (GO:0030036) и фокальных контактов (GO:0005925).

Работа выполнена при финансировании РФФ, грант № 21-65-00017.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЛАТОМА МУКОВИСЦИДОЗА МЕТОДОМ ПРОТОННОЙ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Силантьев А.С.^{1,2}, Мустафина М.Х.¹, Суворов А.Ю.¹, Абдуллаев М.Г.¹, Гогниева Д.Г.¹, Захаржевская Н.Б.²,
Копылов Ф.Ю.¹.

¹ Институт персонифицированной кардиологии Сеченовского Университета

² Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

artsilan@gmail.com 89654032455

Введение: Муковисцидоз (МВ) или кистозный фиброз – аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (CFTR) и поражающее жизненно важные органы и системы. Клинические проявления МВ включают хроническое и прогрессирующее поражение дыхательных путей, экзокринную недостаточность поджелудочной железы, нарушения работы желудочно-кишечного тракта и печени, снижение репродуктивной функции у больных. МВ имеет неблагоприятный прогноз для пациента; летальность составляет 50–60 %, среди детей раннего возраста — выше. Средняя продолжительность жизни больных в России 22–30 лет. Целью настоящей работы являлась оценка эффективности диагностики и оценки тяжести МВ у пациентов методом протонной времяпролетной масс-спектрометрии выдыхаемого воздуха в режиме реального времени. Исследование одобрено этическим комитетом Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Локальный этический протокол № 02-23 от 26.01.2023). Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и зарегистрировано на сайте ClinicalTrials.gov (NCT05727852).

Материалы и методы: Исследование проводилось для групп пациентов с верифицированным МВ; диагноз устанавливался на основании общей клинической картины, потовой пробы и генетического анализа пациентов. Критерии отбора для экспериментальной и контрольной групп указаны в протоколе клинического исследования (NCT05727852). Всего исследование охватило 102 пациента с МВ и 97 пациентов контрольной группы. Исследование выдыхаемого воздуха проводилось с использованием времяпролетного масс-спектрометра с ионизацией методом переноса протона IONICON PTR-TOF 1000 (ПТР-ТОФМС) в режиме реального времени для спокойного и форсированного дыхания пациентов в диапазоне 10–650 m/z.

Результаты: В результате проведенного анализа было отобрано 167 признаков (ионов) для 179 образцов; 20 образцов были исключены в соответствии с критериями качества. Для спокойного дыхания было выявлено 8 достоверных отличий в представленности ионов между группами МВ и контроля; для форсированного выдоха отличия были выявлены для 10 ионов. Для обеих групп были выявлены отличия в представленности для 13 ионов; 5 ионов были выявлены как достоверные отличия для обоих типов дыхания.

С помощью алгоритма градиентного бустинга XGBoost, а также с помощью регрессии LASSO проведена оценка важности предикторов по влиянию на конечную точку (вероятность наличия/отсутствия МВ). Дополнительно был проведен кластерный анализ только среди масс-спектров, демонстрирующий хорошую отрицательную прогностическую ценность (NPV = 0.86, PPV = 0.67). Для обученной модели, построенной по данным форсированного выдоха для 4 отобранных ионов с использованием LASSO-регрессии и 5-кратной кросс-валидации AUC = 0.988 (sensitivity = 0.938, specificity=0.961); для модели спокойного выдоха AUC = 0.975 (sensitivity = 0.887, specificity=0.912).

Выводы: Обученная на предварительно разведанных данных модель показала возможность идентификации муковисцидоза для форсированного и нормального дыхания методом ПТР-ТОФМС. Идентифицированные в качестве маркеров вещества вероятно ассоциированы с развитием патогенной микрофлоры в дыхательных путях пациентов с муковисцидозом. Вместе с тем, роль идентифицированных веществ в патогенезе муковисцидоза требует дополнительного и более глубокого уточнения.

РОЛЬ E3-УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ TRIM29 В РЕГУЛЯЦИИ TP63-ЗАВИСИМЫХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ СЕТЕЙ

Султанов Р.И., Суздаденко А.С, Мулюкина А.С., Зубкова О.А, Климина К.С.,

Богомазова А.Н., Лагарькова М.А. Арапиди Г.П.

Лаборатория системной биологии

Регуляция развития базального эпителия - сложный процесс, который находится под контролем многих транскрипционных факторов. Один из самых известных - это TP63, транскрипционный фактор белкового семейства p53. Несмотря на длительную историю исследований TP63, его функции остаются не до конца изученными. В отличие от TP53 - TP63 обладает меньшей аффинностью к своему мотиву связывания с ДНК. Необходимая специфичность связывания с регуляторными элементами обеспечивается большим количеством белков-партнеров TP63. Часто, именно белки-партнеры определяют транскрипционную программу TP63.

На основе анализа данных секвенирования РНК, метилирования ДНК и больших геномных перестроек мы показали, что убиквитин-лигаза TRIM29 может являться одним из ключевых регуляторов транскрипционной программы TP63. С использованием клеточных моделей мы показали, что как сверхэкспрессия TRIM29, так и нокдаун TRIM29 изменяют транскрипционную программу TP63. Но механизм регуляции оставался не ясным. Мы показали, что сверхэкспрессия TRIM29 не приводит к увеличению представленности TP63 в клетке, однако TRIM29 связывается с TP63 напрямую. Что интересно, TP63 не является субстратом для E3-убиквитин-лигазы TRIM29 *in vitro* и *in vivo*, но, наоборот, TRIM29 увеличивает стабильность TP63 при таких генотоксических стрессах как облучение ультрафиолетом, обработкой H₂O₂ и доксорубицином, препятствуя его протеосомальной деградации. Более того методами конфокальной микроскопии и иммунопреципитации хроматина мы показали, что TRIM29 ко-локализуется с TP63 на хроматине, и совместные локусы связывания TP63 и TRIM29 обогащены генами, которые изменяют свою экспрессию только при совместной сверхэкспрессии TP63 и TRIM29. Таким образом можно сделать вывод, что TRIM29 стабилизирует TP63 непосредственно на хроматине.

В этой работе мы на основе открытых данных предсказали новый ко-регулятор TP63 -убиквитин-лигазу TRIM29 и попробовали объяснить молекулярный механизм регуляции TRIM29 активности TP63 как транскрипционного фактора. Мы экспериментально показали, что TRIM29 стабилизирует TP63 и блокирует его протеосомальную деградацию. Также мы показали, что TRIM29 связывается с TP63 непосредственно на хроматине и регулирует экспрессию TP63-зависимых генов. Однако, стабилизация TP63 не объясняет все эффекты, которые наблюдаются при экспрессии TRIM29, что оставляет пространство для дальнейшего исследования взаимодействия этих белков.

ОЛЬФАКТОРНЫЕ ПАРОКСИЗМЫ ПРИ ПОРАЖЕНИИ ВИСОЧНОЙ ДОЛИ

Хомутов В.Е.

Отделение неврологии

Представлено описание клинического случая диагностики и лечения пациентки с ольфакторными пароксизмами на фоне считавшегося неуточненным поражения правой височной доли головного мозга, интерес к которому обусловлен незначительной представленностью данного типа функциональных нарушений в клинической литературе.

Пациентка А. 1957 года рождения длительное время наблюдалась неврологом по поводу персистировавших пароксизмов, во время развития которых отмечала «эмоциональную окраску запахов» на фоне дезориентации, что расценивалось наблюдавшим ее амбулаторно врачом как сенесто-ипохондрическая нозология. Неоднократно осматривалась психиатром, явных психопатологических изменений выявлено не было, однако ввиду сохранения жалоб была назначена анксиолитическая терапия, не улучшившая впоследствии качество жизни пациентки.

В 2021 году поступила в ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М Лопухина ФМБА в отделение терапевтического профиля, осмотрена неврологом, рекомендовано выполнение ЭЭГ с функциональными пробами, по результатам которой выявлены единичные островолновые потенциалы над правой височной долей. Согласно заключению МРТ головного мозга от 2021 года были выявлены «признаки поражения правой височной доли на фоне перенесенного энцефалита». Назначена противоэпилептическая терапия, снизившая частоту и длительность пароксизмов, при этом полностью их не исключившая. Начато динамическое наблюдение. Согласно заключению МРТ головного мозга в динамике выявлены «признаки перенесенного инфаркта правой височной доли», по ЭЭГ - островолновые потенциалы над правой височной долей с меньшим индексом представленности. При очной оценке МРТ головного мозга от середины 2023 года выявлены признаки поражения височной доли с распространением на медианные отделы и формированием деформации вентрикулярной системы, что послужило предпосылкой для направления пациентки на консультацию специалиста нейрохирургического профиля - суждения в пользу диффузного образования правой височной доли. Проведено оперативное лечение, позволившее полностью редуцировать вышесказанные пароксизмы вне нарастания неврологического дефицита.

Вкусовые, обонятельные, вестибулярные и слуховые нарушения, вегетосенсорные проявления свойственны как височным, так и инсулярным приступам и не имеют топики-диагностической ценности. Тем не менее определение роли инсулярной доли в эпилептическом процессе неинвазивными методами диагностики является трудноосуществимой и в связи с этим актуальной задачей.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИПСК МАКАКИ-РЕЗУС С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОБ

Цховребова Л. В., Богомазова А. Н.

Лаборатория клеточной биологии

Одним из перспективных направлений регенеративной медицины является получение материала для трансплантаций из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. При этом в доклинических испытаниях медицинских технологий нередко возникает необходимость использовать приматов и, в частности, макак-резус (*Macaca mulatta*). Таким образом, для таких исследований нужно получать ИПСК макак-резус, которые перед использованием должны пройти необходимый контроль качества. Контроль качества ИПСК обязательно включает цитогенетический анализ, поскольку в некоторых линиях ИПСК человека после репрограммирования и культивирования наблюдали крупномасштабные геномные перестройки и аномалии кариотипа.

Цитогенетический анализ включает в себя получение препаратов метафазных хромосом, которые окрашивают дифференциально с использованием трипсина и красителя Гимза (GTG-окраска), после чего проводят кариотипирование. Цитогенетический анализ требует высокой квалификации как на этапе приготовления препаратов, так и при кариотипировании. Помимо высокой квалификации специалистов, дополнительную сложность доставляет в невысокий процент метафазных пластинок, доступных для анализа, и недостаточная контрастность бэндов в целом.

Альтернативой классическому бэндингу, которая может решить проблему низкой контрастности бэндов, может служить флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, специфичных к диспергированным Alu- и L1-повторам. Alu- и L1-повторы локализуются в светлых и темных бэндах GTG-окрашивания, соответственно, и могут быть окрашены разными флуорофорами.

В нашей работе был проведен анализ полиморфизма наиболее распространенных в геноме макаки-резус Alu- и L1-повторов, AluYR2 и L1-RS2, соответственно. К консервативным участкам этих повторов были подобраны две олигонуклеотидные пробы для AluYR2-повтора и пять проб для L1-RS2 повтора, составлен профиль их распределения по хромосомам, проанализирована доля выявляемых при помощи проб Alu- и L1-повторов. На конференции будут представлены изображения метафазных хромосом макаки-резус, полученные при помощи FISH с различными комбинациями олигонуклеотидов, с сопоставлением с классическим GTG-окрашиванием.

Работа выполнена в рамках Государственного задания «Репрограммирование», номер государственного учета НИОКТР 122040800024-3.

ВЛИЯНИЕ ВЕЗИКУЛ *BACTEROIDES FRAGILIS* НА АКТИВНОСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В МОДЕЛИ DSS-ИНДУЦИРОВАННОГО КОЛИТА

Шагалеева О.Ю.¹, Кашатникова Д.А.¹, Кардонский Д.А.¹, Иванов В.А.², Воробьева Е.А.¹, Конанов Д.Н.³, Силантьев А.С.¹, Зоркина Я.А.⁴, Абрамова О.В.⁴, Зубков Е.А.⁴, Морозова А.Ю.⁴, Ефимов Б.А.¹, Олехнович Е.И.⁵, 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

⁵ Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Введение: Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) характеризуются наличием длительно формирующегося воспаления разного генеза в стенке кишечника. На фоне ВЗК происходят структурные изменения микробиома, являющиеся поддерживающей силой патологического процесса. Нормализация микрофлоры может способствовать снижению активности воспалительной реакции, однако существующие пробиотические препараты не обладают описанными свойствами. С другой стороны, для ряда представителей рода *Bacteroides* отмечены иммуномодулирующие эффекты везикул – бактериальных секреторных производных. В данном исследовании мы предполагаем, что везикулы *Bacteroides fragilis JIM10* могут влиять на тяжесть течения воспалительного процесса. Свою гипотезу мы проверяем в модели DSS индуцированного колита у мышей.

Материалы и методы: Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6, возрастом 6-7 недель. Мыши были разделены на три группы: К (n=10), DSS (n=10), DSS+OMV (n=10). Эксперимент включал в себя два цикла воспаление/ремиссия, каждый по 10 дней. Группа DSS+OMV с 11-20 дни получала везикулы концентрацией 1 мг/кг. Каждые 3 дня производили взвешивание мышей и забор образцов стула для детекции летучих метаболитов (ЛОС) с помощью ГХ-МС с парофазной экстракцией, а также для метагеномного секвенирования. Клинические проявления воспаления оценивали с помощью индекса активности заболевания (ИАЗ). В конце эксперимента животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Для гистологического исследования толстую кишку извлекали из брюшной полости, фиксировали в формалине и заливали в парафиновые блоки. Окрашивали гистологические образцы гематоксилином и эозином.

Результаты: В первый цикл эксперимента в группах DSS, DSS+OMV, 1-5 дни наблюдался одинаковый рост показателей ИАЗ. В следующие пять дней отмечались признаки ремиссии. Во второй цикл, появились значимые отличия в группах DSS и DSS+OMV. По клиническим показателям состояние животных группы DSS значительно ухудшалось, в то время как у животных группы DSS+OMV значения ИАЗ не превышали значений первого цикла. Согласно данным, полученным с помощью ГХ-МС с парофазной экстракцией, соотношение ЛОС отличалось во всех анализируемых группах. При этом при воздействии OMV соотношения ЛОС стремились к исходным. Метагеномный анализ по 16s rPHK показал, что состав микробиоты в группе DSS+OMV после курса терапии стремился к первоначальному состоянию, в отличие от группы DSS, не получавшей лечение. Также положительное действие препарата на основе везикул показала гистологическая картина, где изменения в структуре ткани кишечника были менее выражены в группе DSS+OMV.

Выводы: Препарат на основе везикул *Bacteroides fragilis JIM10* показал положительное терапевтическое действие. Для более выраженного долгосрочного терапевтического эффекта необходима разработка комплексного препарата, позволяющего одновременно снижать активность воспалительного процесса и параллельно восстанавливать состав микробиоты.

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

НОВЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АРХИТЕКТУРЫ СЛОЖНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Юльметова Л.Н., Скородумова Л.О., Кулемин Н.А., Шарова Е.И.

Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Несмотря на широкую распространённость полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), их сфера применимости ограничена. Межгенные и межнуклеотидные взаимодействия, в том числе гаплотипы, сцепленные с возможными патогенными вариантами, также, как правило, не оцениваются. Методы машинного обучения, по-видимому, способны частично преодолеть недостатки GWAS во многом благодаря их способности выявлять эпистатические взаимодействия. Поэтому в данной работе мы сосредоточились на адаптации методов машинного обучения к задачам выявления новых кандидатных локусов. Мы показываем, как сделать модели более прозрачными для понимания генетической архитектуры сложных заболеваний.

Дистрофия роговицы Фукса (ДФ) имеет две ключевые характеристики: во-первых, около 75-80% случаев связаны с экспансией повторов в гене TCF4, во-вторых, заболевание имеет большую распространённость среди женщин (соотношение полов до 3.5:1). Мы сосредоточили свое внимание на когорте пациентов без экспансии повторов (далее когорта EXP-), поскольку их генетическая основа остается неясной (за исключением редких случаев, вызванных мутациями в генах COL8A2 и SLC4A11). Однако крупнейший набор данных генотипов, связанных с ДФ (1726 пациентов и 2410 здоровых людей из контрольной группы) не предоставляет информации о статусе экспансии. Поэтому в качестве первого шага мы разработали подход к стратификации пациентов со схожими генетическими причинами, базирующийся на кластеризации soft k-means. Данный подход был валидирован на двух дополнительных выборках с определенным нами статусом экспансии: на основе данных проекта «1000 геномов» (типированных на повторы алгоритмом ExpansionHunter Denovo) и нашей локальной когорте (типированной фрагментным анализом).

На втором этапе мы сконструировали нейросеть, смысловыми узлами которой для первого скрытого слоя являются гены. В модель также был включен полносвязный слой с двумя нейронами для учета эпистатических взаимодействий. Мы достигли точности 98% (AUC=99.5%) в классификации бинарного фенотипа для всего набора данных и точности 97% (AUC=98.7%) для когорты EXP-. Кроме того, нейросеть определила как образцы с экспансией два образца из валидационной локальной когорты, первично типированных как образцы без экспансии. Повторная проверка двумя экспериментальными методами подтвердила наличие экспансии в этих образцах, т.е. ошибку первичного типирования.

Для детекции значимых в классификации локусов мы рассчитали важность каждого признака (гена) с помощью алгоритмов SHAP и Integrated Gradients. Так как нейросеть обучалась стохастически и, следовательно, относительная важность локусов варьировалась между запусками, для каждого сравнения мы выполнили по 8 повторных запусков. В качестве кандидатов мы рассмотрели локусы, входящие в топ-50 значимых генов (согласно оценкам или Integrated Gradients, или SHAP) как минимум в 4 запусках. Всего для дальнейшего рассмотрения было выделено 54 гена для сравнения EXP- случаев и контроля.

Поскольку среди результатов работы нейросети было 2 гена с известными патогенными экспансиями (ATXN8OS, DAB1), нами был разработан и проведен анализ перепредставленности генов с популяционными экспансиями в приоритезированных генах. Мы обнаружили, что гены, отобранные с использованием предложенного подхода, были значительно обогащены сайтами STR (OR=6.3, p-value=4.2e-08) в отличие от тех генов, которые были отобраны с использованием смешанной логистической модели для GWAS (OR=1.5, p-значение=0.28). Это может указывать на общий механизм патогенеза большинства случаев ДФ.

Работа выполнена за счет гранта Президента РФ для молодых учёных – кандидатов наук МК-2951.2022.1.4 и гранта РФФИ № 22-75-10157, <https://rscf.ru/en/project/22-75-10157/>.

ВЛИЯНИЕ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИМ АГЕНТАМ

Шнайдер П.В., Лукина М.М., Арапиди Г.П., Иванова О.М., Лашкин А.И., Шендер В.О.

Лаборатория молекулярной онкологии

Ранее нашей и другими группами было показано, что коммуникация между опухолевыми клетками во время химиотерапии вносит вклад в развитие химиорезистентности. Чтобы глубже разобраться в этом явлении, мы сосредоточили наши исследования на клеточной модели рака яичника, одного из самых смертельных гинекологических заболеваний. Наше предыдущие исследования показали, что погибающие опухолевые клетки выделяют во внеклеточную среду молекулы (включая сплайсосомальные белки), которые приводят к формированию химиорезистентности опухолевых реципиентных клеток. Однако механизм, лежащий в основе этого процесса, остается неизвестным.

В этой работе секретомы, индуцированные терапией (АпоС), или контрольные секретомы были собраны от донорных опухолевых клеток, обработанных или необработанных цисплатином, соответственно. Реципиентные клетки инкубировали с полученными АпоС или контрольными секретомы в течение 3 дней. Протеомный анализ реципиентных клеток показал, что инкубация с АпоС повышает представленность белков, участвующих в сплайсинге РНК и репарации ДНК. Кроме того, мы продемонстрировали, что сплайсосомальные белки были инкапсулированы во внеклеточные везикулы.

Затем мы показали, что АпоС спасают реципиентные клетки от различных ДНК-повреждающих агентов, но не от других типов препаратов. Используя флуоресцентную микроскопию, анализ ДНК-комет и анализ клеточного цикла, мы обнаружили, что предварительная инкубация реципиентных клеток с АпоС приводит к приобретению химиорезистентности за счет удлинения S-фазы клеточного цикла, уменьшения фрагментации ДНК и снижения числа аддуктов цисплатин-ДНК, а также уменьшения уровня фосфорилирования RPA2. Таким образом, один из основных эффектов АпоС на реципиентные клетки заключается в улучшенной эффективности разрешения аддуктов цисплатин-ДНК и репарации вызванных ими повреждений.

Эти результаты показывают, что химиотерапия ДНК-повреждающими агентами способствует секреции погибающими опухолевыми клетками сигнальных молекул в составе внеклеточных везикул. Эти молекулы эффективно спасают оставшиеся опухолевые клетки от повреждения ДНК, регулируя клеточный цикл и способствуя репарации ДНК, что в конечном итоге приводит к химиорезистентности.

В заключение, это исследование раскрывает один из механизмов, лежащих в основе приобретенной химиорезистентности, а также дает важную информацию о преобразовании межклеточной коммуникации опухолевых клеток во время лечения.

Работа была поддержана грантом 22-15-00462 РФФ.

ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ВЛИЯНИЕ СУБИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ НА СТАФИЛОФАГИ СЕМЕЙСТВ *HERELLEVIRIDAE* И *ROUNTREEVIRIDAE*

Абдраймова Н. К., Корниенко М. А., Шитиков Е. А.

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

Бактериофаги (фаги) – вирусы, способные инфицировать бактериальные клетки. Совместное применение вирулентных (литических) фагов с антибиотиками рассматривается в качестве перспективного терапевтического подхода против инфекций, в частности против *S. aureus* (Абдраймова и др., 2022). Однако, несмотря на значительный прогресс, вопросы взаимодействия антибиотиков и бактериофагов все еще остаются открытыми. Неоднозначные результаты текущих исследований подчеркивают необходимость дальнейшего изучения этой области для лучшего понимания взаимного влияния антибиотиков и фагов.

Целью работы было изучить влияние субингибирующих концентраций антибиотиков (линезолид, оксациллин, тетрациклин) на стафилофаги семейств *Herelleviridae* (vB_SauM-515A1) и *Rountreeviridae* (vB_SauP-436A1).

В работе использовали литические стафилофаги vB_SauM-515A1 (сем. *Herelleviridae*) и vB_SauP-436A1 (сем. *Rountreeviridae*), выделенные из терапевтического препарата НПО «Микроген». Также в исследование были включены 10 штаммов *S. aureus*, характеризующиеся клинически значимыми сиквенс-типами и обладающие множественной лекарственной устойчивостью. Эффективность лизиса штаммов фагами оценивали на основании анализа кривых роста клеток, зараженных фагом при различных значениях множественности инфекции. Оценка влияния субингибирующих концентраций антибиотиков (линезолид, оксациллин, тетрациклин) проводили в ходе анализа кривых единичного цикла роста и расчета частот образования мутантов, устойчивых к бактериофагам. Кривые единичного цикла роста фагов получали по стандартной методике (Kornienko *et al.*, 2020). Частоту образования устойчивых мутантов к бактериофагам при действии антибиотиков и без них оценивали согласно методу, адаптированному из Kaur *et al* (2014).

Результаты оценки эффективности лизиса показали, что 100% штаммов были чувствительны к фагу vB_SauM-515A1, в то время как к vB_SauP-436A1 – 90% бактерий. Образование устойчивых мутантов наблюдали только в случае с фагом *Rountreeviridae*. Частоты образования мутантных клонов стафилококков, устойчивых к vB_SauP-436A1, в присутствии антибиотиков не отличались от контроля, за исключением случая с оксациллином, при добавлении которого частота образования устойчивых мутантов снижалась на порядок. Присутствие антибиотиков оказывало незначительное влияние на размножение бактериофагов: в отдельных случаях наблюдалось небольшое увеличение длительности жизненного цикла и сокращение выхода фаговых частиц. Исключением являлся тетрациклин, значительно ограничивающий выход фаговых частиц из клетки.

Таким образом, субингибирующие концентрации антибиотиков ограничивают размножение представителей *Herelleviridae* и *Rountreeviridae*, в отдельных случаях антибиотики препятствуют образованию устойчивых к фагу мутантов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТВЕТА НА КРАТКОВРЕМЕННЫЙ ПРОПИОНАТНЫЙ СТРЕСС ДВУХ ШТАММОВ *E.coli* МЕТОДОМ кПЦР, СОПРЯЖЕННОЙ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ

Авшалумов А.С.^{1,2}, Горбачев А.Ю.¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Введение. *Escherichia coli* с адгезивно-инвазивным фенотипом является частым спутником воспалительных заболеваний кишечника, включая болезнь Крона. Ранее было показано, что культивирование на среде, содержащей пропионат, может стимулировать адгезивно-инвазивные свойства *Escherichia coli*. Клинический изолят штамма ZvL2, демонстрирует активацию адгезивно-инвазивных свойств при культивировании в течение 5 пассажей на пропионате. Действие пропионата обратимо, повторное пассирование изолята на среде с добавлением глюкозы приводит к потере его вирулентных свойств. В связи с этим представляет интерес регуляция транскрипции генов, происходящая на ранних стадиях культивирования.

Цель. Сравнение ответа на кратковременный пропионатный стресс двух штаммов *Escherichia coli* (адгезивно-инвазивного штамма ZvL2 и лабораторного штамма MG1655) путем оценки уровня транскрипции набора из 10 генов, выявленных в результате протеомного профилирования.

Материалы и методы. Изолят *Escherichia coli* ZvL2 получен путем эндоскопии от пациента с болезнью Крона. Для сравнения использовался лабораторный штамм *Escherichia coli* MG1655. Оба штамма культивировались на глюкозе до середины экспоненциальной фазы роста. Далее клетки осаждались и ресуспендировались в среде M9, содержащей пропионат, после чего культивировались в трех биологических повторах в течение 0, 15, 30, 60 и 120 минут при 37°C. Далее из всех образцов была выделена РНК. Первая цепь кДНК строилась при помощи ревертазы MMLV. В качестве референса для оценки изменения уровня транскрипции был выбран ген *rrsA*. Далее все образцы кДНК использовались в качестве матрицы для ПЦР с детекцией в режиме реального времени в трех технических повторах.

Результаты. В результате построения и анализа кривых амплификации было установлено, что хотя целевые гены присутствуют в геномах обоих исследуемых штаммов, они демонстрируют кардинально разные уровни транскрипции в условиях кратковременного пропионатного стресса.

Наиболее значительное изменение уровня транскрипции у штамма ZvL2 наблюдалось для гена 2-метилцитратсинтазы – *prpC*, участвующей в утилизации пропионата. Число копий молекул РНК, кодируемых этим геном, на клетку *E.coli* превысило аналогичное число у MG1655 более чем в 3500 раз. Это свидетельствует о значительной активации метаболического пути утилизации пропионата у ZvL2 в отличие от лабораторного штамма. У обоих штаммов сильно увеличился уровень транскрипции гена *astC*, кодирующего сукцинилорнитин трансминазу – фермента, участвующего в пути деградации аминокислот, что является ответной реакцией на состояние голода, вызванного изменением источника углерода. Разница в числе молекул РНК, кодируемых этим геном, на клетку *E.coli* между штаммами составила почти семь раз. Разница в уровне транскрипции других анализируемых генов оказалась менее существенной, однако в случае штамма ZvL2 уровень транскрипции большей части генов превышал уровни транскрипции у MG1655 не менее, чем в два раза, что говорит о его лучшей адаптации к пропионатному стрессу.

Выводы. Клинический изолят *E.coli* ZvL2 проявляет значительно более быстрый и сильный ответ на пропионатный стресс по сравнению с лабораторным штаммом MG1655. Ответ проявляется в виде увеличения уровня транскрипции некоторых генов метаболизма, а также генов, ответственных за регуляцию адгезивно-инвазивных свойств.

РАЗРАБОТКА КАРТРИДЖНОЙ СИСТЕМЫ ПРОВЕДЕНИЯ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АНАЛИЗА НА ТРОПОНИН I НА МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦАХ

К.А. Прусаков, К.Г. Алдаров, А.В. Мезин, М.Н. Бажутов, А.П. Каныгин, Д.В. Басманов

Лаборатория прикладных биомедицинских микросистем ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
Москва, Россия

Использование микрофлюидных технологий совместно с интеллектуальными автоматизированными анализаторами способно вывести существующие диагностические методики на качественно новый уровень. Благодаря микрофлюидному подходу появляется возможность сократить объемы, а значит и стоимость, реагентов в пересчете на один анализ, сократить общее время анализа, упростить процедуру утилизации реагентов различных классов опасности в силу замкнутости микрофлюидной системы. При этом автоматизированная система проведения самого анализа позволяет говорить о возможности проводить сложные лабораторные анализы вне лаборатории без привлечения высококвалифицированных специалистов. В настоящий момент попытки создания таких систем предпринимаются во многих странах мира. При попытке создания прототипа отечественной микрофлюидной системы медицинской диагностики, которая учитывала бы технологии масштабирования методом литья термопластичных пластиков под давлением, нами были использованы научные и технологические заделы в области микрофабрикации, микрофлюидики, аналитического приборостроения, а также использовано современное высокотехнологичное научное и производственное оборудование.

Целью данной работы является создание микрофлюидных чипов и процессирующего устройства для проведения полуавтоматического анализа на тропонин I.

В ходе выполнения работы разработан прототип микрофлюидного картриджа, предназначенный для автоматического процессирования реагентов внутри чипа по заранее предоставленному Институтом биохимической физики РАН протоколу иммуноферментного анализа на магнитных наночастицах для последующей электрохимической детекции содержания тропонина I в клиническом образце. Для реализации полуавтоматического анализа в картридже был разработан оригинальный интегрированный многоходовой микрофлюидный клапан-распределитель. Были изготовлены отдельные узлы и собран экспериментальный стенд для процессирования микрофлюидного картриджа и управления многоходовыми микрофлюидными распределителями в автоматическом режиме по разработанному алгоритму и протоколу. Выпущена опытная партия микрофлюидных картриджей. Подготовлена техническая документация для возможной последующей адаптации разработанной технологии под производство чипов методами литья пластиков под давлением.

Работа выполнена в рамках договора ЦТМ-03/23-02 от 14.07.2023.

РАЗРАБОТКА БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО КОНВЕЙЕРА ДЛЯ АВТОМАТИЗАЦИИ ПАРНОГО ЭКЗОМНОГО АНАЛИЗА ОПУХОЛИ.

Бабанина М. В.^{1,3}, Кулемин Н. А.², Горбачев А. Ю.¹

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

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

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Введение. Одним из ключевых факторов в анализе геномных данных является воспроизводимость результатов эксперимента при одинаковых начальных условиях. Поэтому необходим единый конвейер для обработки экспериментальных данных.

Идентификация геномных вариантов является важнейшим шагом понимания молекулярной биологии онкологических процессов, а также определения стратегии лечения. В связи с резким увеличением генетических исследований в последнее десятилетие был разработан ряд программных пакетов, успешно определяющих однонуклеотидные варианты (SNV) и небольшие вставки и делеции (INDEL), при этом в основе каждого решения находятся разные математические модели поиска вариантов. Некоторые алгоритмы определяют большее количество низкочастотных вариантов, многие из которых являются ложноположительными, а другие обладают большей специфичностью, в связи с чем множество корректных вариантов классифицируются как технические ошибки. Соответственно, для формирования наиболее полного списка геномных состояний требуется объединение результатов работы нескольких пакетов. Существует разработанное решение этой задачи, - пакет SomaticCombiner [1], который объединяет списки геномных состояний, полученных с помощью различных алгоритмов, используя подход мажоритарного голосования по частоте определенных аллелей (VAF), который позволяет повысить общую чувствительность протокола. К сожалению, данный программный пакет не подходит для полноценного применения в конвейерах, в связи с отсутствием всех необходимых значений в выходных файлах.

Цель. Разработать универсальный биоинформатический конвейер для автоматизации анализа данных парного экзомного секвенирования опухоли, включающий программный модуль для объединения файлов формата vcf и провести его валидацию на статистических данных.

Результаты. В ходе работы был реализован конвейер, состоящий из двух независимых частей. Первая часть конвейера принимает на вход прочтения в формате файлов fastq, а затем производит их очистку, выравнивание и объединение для дальнейшего поиска вариантов. Также на этом шаге реализован сбор метрик качества секвенирования и выравнивания для оценки применимости данных для анализа. На втором этапе производится поиск соматических и наследственных мутаций, а также определяются профили копийности. Для обобщения результатов определения вариантов был создан скрипт на языке Python, позволяющий сформировать единый выходной vcf-файл для дальнейшей клинической интерпретации пакетом PCGR [2]. Поиск соматических вариантов был реализован с помощью программных пакетов Strelka, Mutect2, Verdict и Varscan. Скрипт был провалидирован на искусственных данных, что позволило выбрать оптимальный набор программ для поиска соматических вариантов.

Список литературы.

1. Wang, M., Luo, W., Jones, K. *et al.* SomaticCombiner: improving the performance of somatic variant calling based on evaluation tests and a consensus approach. *Sci Rep* **10**, 12898 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69772-8>

Sigve Nakken, Ghislain Fournous, Daniel Vodák, Lars Birger Aasheim, Ola Myklebost, and Eivind Hovig. Personal Cancer Genome Reporter: variant interpretation report for precision oncology (2017). *Bioinformatics*. 34(10):1778--1780.
[doi:10.1093/bioinformatics/btx817](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx817)

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ scFv-АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К RBD-ДОМЕНУ SPIKE-БЕЛКА ВИРУСА SARS–COV2

Бровина К.А., Манувера В.А., Графская Е.Н.

ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина,

Лаборатория генной инженерии

Моноклональные антитела широко применяются для диагностики, вирусной нейтрализации при разработке передовых методов лечения, а также в исследовательских целях. Для связывания антигена достаточно использовать одноцепочечные минимоноклональные антитела (scFv-антитела), содержащие переменные фрагменты легкой и тяжелой цепи полноразмерного антитела. Целью данной работы является получить двуцепочечные минимоноклональные антитела без линкера и одноцепочечные минимоноклональные антитела со Strep-tag последовательностью в качестве линкера для исследования их свойств на примере антител, специфичных к RBD-домену Spike-белка вируса SARS-Cov2.

В ходе работы получены генетические конструкции, кодирующие одноцепочечные минимоноклональные антитела на основе описанных в литературе полноразмерных антител REGN10987 и SARS2-38, оценен уровень накопления рекомбинантных белков в *E.coli* и в клеточной линии HEK293, отработана методика выделения минимоноклональных антител из бактериальной культуры. Для получения scFv-антител без линкера два фрагмента ДНК, кодирующие переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела, были объединены в бицистронный оперон в составе вектора на основе плазмиды серии pET. Аналогичным вектор использовался и для получения конструкции, кодирующей минимоноклональные антитела с последовательностью Strep-tag-(G3S)3-Strep-tag в качестве линкера. Полученными плазмидами трансформировали штамм Rosetta2-DE3 *E.coli*. Далее были подобраны условия культивирования бактерий, обеспечивающие максимальную наработку рекомбинантных миниантител. Оба рекомбинантных белка обнаружены в нерастворимой фракции клеточной культуры *E.coli*. После выделения методом аффинной хроматографии scFv-антитела были переведены в растворимую фракцию путем диализа. Кроме того, были собраны две генетические конструкции на основе вектора pcDNA для получения scFv с последовательностью Strep-tag-(G3S)3-Strep-tag в качестве линкера в клетках человека. Оценка их функциональности была проведена с использованием иммуоферментного анализа (ИФА); для минимоноклональных антител, линкер которых содержит StrepTag, была проведена дополнительная оценка с применением конъюгата белка стрептавидина и пероксидазы хрена.

АНАЛИЗ СОГЛАСОВАННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЖИРОВОЙ И БЕЗЖИРОВОЙ МАССЫ ТЕЛА, А ТАКЖЕ ДОЛИ ЖИРОВОЙ МАССЫ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОИМПЕДАНСОМЕТРИИ И УЛЬТРАЗВУКОВОГО СКАНИРОВАНИЯ В ГРУППЕ ВЗРОСЛЫХ МОСКВИЧЕК

Бондарева Э.А., Парфентьева О.И., Гаджихмедова А.Н., Кулемин Н.А.

Лаборатория молекулярной генетики человека

Количественное определение компонентов состава тела необходимо в медицинских целях для оценки количества мышечной массы тела у пожилых и тяжелобольных пациентов, в скрининговых популяционных исследованиях распространенности ожирения, для оценки индивидуального риска развития коморбидных ожирению или саркопении заболеваний, в практике подготовки спортсменов, а также в антропологических исследованиях различных популяций современного человека.

Целью исследования является анализ согласованности оценок абсолютных значений жировой и безжировой массы тела, а также доли жировой массы тела, полученных с применением российского оборудования для биоимпедансометрии (ABC-02 «Медасс») и ультразвукового сканера BodyMetrix™ (IntelaMetrix, США) в группе женщин, проживающих в г. Москве. было проведено одномоментное, одноцентровое, обсервационное антропометрическое обследование 180 женщин в возрасте от 18 до 67 лет. В обследованной выборке присутствовали женщины с различным нутритивным статусом, определенным по значению ИМТ. Программа обследования включала измерение длины тела и массы тела, обхватов талии и бедер неэластичной лентой, определение состава тела с применением ультразвукового сканера BodyMetrix™ (IntelaMetrix, США) и биоимпедансного анализатора (ABC-02 «Медасс», НТЦ Медасс, Россия).

Не было обнаружено статистически значимых различий для ЖМ ($p = 0.23$), %ЖМ ($p = 0.63$) и БЖМ ($p = 0.28$), определенных методом УЗИ и БИА, на общегрупповом уровне. Для оценки размера эффекта рассчитывали g Хеджеса для зависимых выборок. Для всех исследуемых признаков, размер эффекта близок к нулю, т.е. является несущественными с точки зрения разницы средних значений на групповом уровне ($g_{\%ЖМ} = -0.1 \ 0,0 \ 0.1$, $g_{ЖМ} = -0.06 \ 0,0 \ 0.06$ и $g_{БЖМ} = 0.07 \ 0.15 \ 0.22$).

Анализ Бленда-Олтмана позволяет сделать следующие выводы: для всех исследуемых признаков обнаружено незначительное систематическое смещение 0,1% для доли ЖМ, 0,5 кг для ЖМ и 0,4 кг для БЖМ, что подтверждает ничтожный размер эффекта при сравнении данных на общегрупповом уровне. Анализ согласованности оценок состава тела в целом в обследованной выборке выявил низкий уровень согласованности для %ЖМ и БЖМ ($CCC = 0.70 \ 0.76 \ 0.81$ и $CCC = 0.86 \ 0.89 \ 0.91$, соответственно), для ЖМ согласованность оценок можно оценить как среднюю ($CCC = 0.90 \ 0.92 \ 0.94$). После внесения корректировок ($\%ЖМ_Медасс_кор = (\%ЖМ_Медасс + 10)/1.3$, $ЖМ_Медасс_кор = (ЖМ_Медасс + 4.4)/1.24$ и $БЖМ_Медасс_кор = (БЖМ_Медасс - 13)/0.72$) был проведен реанализ согласованности. Коррекция позволяет добиться среднего уровня согласованности данных для оценок ЖМ и БЖМ. Не удалось добиться значительного улучшения согласованности данных %ЖМ после введения коррекции. Полученные результаты позволяют предположить, что согласованность данных методов у людей с морбидным ожирением требует отдельного исследования, так как включение добровольцев с III степенью ожирения значительно снижает согласованность данных.

Финансирование работы: исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ №22-75-10122 «Оценка влияния эндогенных и экзогенных факторов на развитие различных типов ожирения».

Исследование специфичности нового класса лигандов к G-квадруплексам.

В.А. Долгушева, А.В. Аралов, В.В. Северов

Лаборатория структуры и функции биополимеров

Фотодинамическая терапия основана на проведении фотохимической реакции, которая происходит при активации сенсбилизатора светом в определенном диапазоне длин волн. Недавно в рамках этого направления появился подход к терапии рака, который заключается в связывании лиганда с G4 и его последующей фотосенсибилизации, что приводит к повреждению ДНК. Развитие этого подхода лимитировано недостаточной специфичностью доступных лигандов, преимущественно порфиринового ряда, к G4.

Данная работа представляет собой попытку дизайна избирательных к G4 фотосенсибилизаторов. В качестве основы лигандов использовали известный краситель Nile Blue, который представляет собой производное бензофеноксазина, т.е. содержит плоскую гетероароматическую структуру, способную к стекинг-взаимодействиям с внешними тетрадами и/или интеркаляции между тетрадами G4. Для повышения селективности к G4 проводили клик-реакцию диазидопроизводного Nile Blue с алкинами, несущими различные заместители: аминоалкильный (для взаимодействия с ДНК-остовом) и контрольные с карбонильной и гидроксильной группами (рис. 1).

Взаимодействие полученных лигандов с различными G4 изучали с помощью спектроскопии кругового дихроизма, а константу диссоциации определяли методом микромасштабного термофореза. Показано, что все лиганды селективно связываются с параллельными G4 и искажают их структуру, при этом оказывает стабилизирующий эффект. Лиганды слабо связываются с дуплексными ДНК, а также антипараллельными G4, предположительно, за счет ионных взаимодействий.

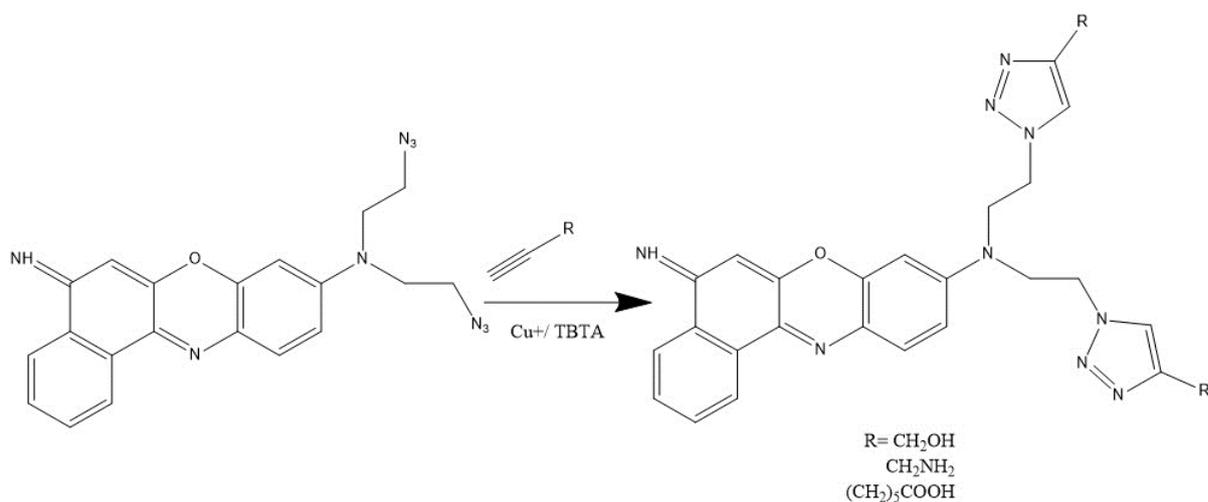


Рис. 1. Реакция азид-алкинового циклоприсоединения бензо[а]феноксазинового производного с R-CCH, где R=CH₂OH; CH₂NH₂, (CH₂)₅COOH.

ГЕНЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПЕРВИЧНЫМИ ИММУНОДЕФИЦИТАМИ (ПИД), КАК КЛЮЧЕВЫЕ ГЕНЫ ПРИ SARS-CoV-2 ИНФЕКЦИИ

Кашатникова Д.А.^{1,2}, Захаржевская Н.Б.¹, Сальникова Л.Ю.²

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

² Лаборатория экологической генетики ФГБУН Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН

daria_sv11@mail.ru, 8(916)2830623

Введение. Считается, что развитие тяжелой формы COVID-19, представляющей собой сложное многофакторное заболевание, связано со многими генами, действие которых регулируется генетическими и экологическими факторами. Сосредоточившись на идеях омнигенной модели, при которой сложные наследственные признаки формируются совместным действием коровых (основных) и периферических генов, было принято решение рассмотреть, как гены, ассоциированные с ПИД, и их периферические околядерные гены (функциональные гены-партнеры), связанные с генами ПИД по сети белков, могут вносить вклад в развитие тяжелой формы течения COVID-19.

Материалы и методы. В данный анализ были включены результаты секвенирования всего экзома 20 пациентов в возрасте ≤ 45 лет с тяжелым ($n = 9$) и умеренным/легким течением COVID-19 ($n = 11$). Список генов ПИД был взят из отчета IUIS (Международное сообщество иммунологов). Наборы генов-партнеров были сформированы с помощью базы данных STRING 11.5 версии: гены ПИД (I), функциональные партнеры ПИД генов с оценками комбинированных взаимодействий $\geq 0,9$ (II) и от 0,4 до 0,89 (III). Гены в данных наборах были разделены по биологической значимости: гаплонедостаточные, эссенциальные, нетолерантные к LoF-мутациям, иммунные тканеспецифические.

Результаты. Полученные наборы включали 450 генов ПИД (I), 4580 генов (II) и 6445 генов (III), которые в значительной степени пересекались, поэтому одинаковые гены были исключены: гены ПИД были исключены из II набора, а также гены ПИД и гены II набора из III набора. При сравнении ПИД генов (I) со II и III наборами было обнаружено, что они участвуют в схожих биологических процессах и метаболических путях. В данных наборах генов рассматривались потенциально патогенные редкие генетические варианты (high impact (HI) варианты) во всех группах сравнения. Было обнаружено избыточное количество редких HI вариантов на уровне всего экзома у пациентов с тяжелой формой течения COVID-19. При объединении ПИД генов с их функциональными партнерами были получены большие эффекты среди редких HI вариантов, наблюдалось возрастание эффекта: все гены $< I+II+III < I+II$ наборы генов. Но более высокие ассоциативные эффекты были при рассмотрении редких HI вариантов в гаплонедостаточных, эссенциальных и нетолерантных к LoF-мутациям генах у пациентов с тяжелой формой течения COVID-19, по сравнению с легкой/умеренной формой COVID-19.

Вывод. Данный анализ расширил омнигенную гипотезу. Он показал, что более высокий эффект наблюдался при рассмотрении суммарного действия редких HI вариантов в периферических и коровых генах (I+II) у пациентов с тяжелой формой течения COVID-19, по сравнению с эффектом во всех остальных рассматриваемых генах.

ПОЛИМОРФИЗМ RS1050152 АССОЦИИРОВАН С СОСТАВОМ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

И.В. Колесникова¹, М.И. Маркелова², Д.Р. Хуснутдинова², А.М. Сенина², М.Н. Синягина², С.Р. Абдулхаков², Н.Б. Захаржевская³, О.Ю. Шагалева³, С.В. Лямина⁴, Т.В. Григорьева²

¹ФГАУ НМИЦ ЛРЦ Минздрава РФ, Москва, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

⁴ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова»

Введение: известно, что микробиота кишечника пациентов с Болезнью Крона (БК) характеризуется специфическим дисбиозом, который выражается общим снижением разнообразия и увеличением доли условно-патогенных микроорганизмов. При этом генотип хозяина играет роль в формировании стабильного микробного сообщества кишечника. Одним из генетических вариантов, ассоциированных с БК является rs1050152 в гене SLC22A4. Данный ген кодирует белок-транспортер OСТN1, экспрессирующийся в различных тканях, в том числе и в кишечнике. Целью данной работы явилось установление ассоциации варианта rs1050152 в гене SLC22A4 с микробиотой кишечника у пациентов с БК.

Материалы и методы: для работы были собраны образцы кала и крови от 66 пациентов с БК и 25 здоровых добровольцев. Из образцов кала выделяли ДНК с последующим секвенированием ампликонов гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina, США). Определение генотипов варианта rs1050152 в гене SLC22A4 проводили методом MALDI-TOF минисеквенирования. Кластеризация (определение энтеротипов) образцов микробиоты производилась с помощью метода DMM (Dirichlet multinomial mixtures. Для оценки различий частоты встречаемости аллелей использовался точный критерий Фишера.

Результаты: было выявлено, что в группе пациентов с БК достоверно чаще встречается аллель *rs1050152^T* в гене *SLC22A4* по сравнению с группой контроля (30.3% и 4.0%, соответственно, OR=9.7, 2.8-66.1, p<0.001). Среди образцов кишечной микробиоты было выявлено 2 кластера-энтеротипа: все 25 образцов от здоровых добровольцев и 47 образцов от пациентов с БК составляют I кластер, тогда как остальные 19 образцов микробиоты пациентов с БК представляют кластер II. Второй кластер отличается сниженной представленностью семейств *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae* и *Ruminococcaceae*, тогда как доли *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* и *Enterococcaceae* были повышены по сравнению с первым кластером-энтеротипом. Таким образом, энтеротип II характеризуется дисбиозом. В группе пациентов с БК, микробиота которых составляет II кластер, частота аллеля *rs1050152^T* в гене SLC22A4 выше, чем среди пациентов с БК, микробиота которых относится к I кластеру (44.7% и 24.5%, соответственно, OR=2.5, 1.1-5.5, p=0.03).

Выводы: выявленные отличия частоты встречаемости БК-ассоциированного аллеля *rs1050152^T* в гене *SLC22A4* в зависимости от энтеротипа микробиоты кишечника пациентов с БК свидетельствуют о роли генотипа человека в формировании бактериального сообщества кишечника.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ НОРМАЛИЗОВАННЫХ БИБЛИОТЕК ДЛЯ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Ли А.В.^{1,2}, Уразаева Д.Р.^{1,2}, Авшалумов А.С.^{1,2}, Горбачев А.Ю.¹

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

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

РНК-секвенирование - это широко используемый подход к профилированию транскриптома. Как правило, популяция РНК преобразуется в библиотеку фрагментов кДНК с адаптерами, лигированными к одному или обоим концам. Известно, что тотальная бактериальная РНК содержит около 90-95% рибосомальной РНК (рРНК) при ее сборе во время экспоненциального роста. Следовательно, простое секвенирование тотальной РНК неэффективно, ввиду того, что большинство прочтений будет отображать рРНК или транспортную РНК. Поэтому также необходимо проводить процедуру нормализации кДНК, то есть повышать обнаружение более редких транскриптов матричной РНК.

Ранее в нашей лаборатории успешно применили метод нормализации, основанный на дуплекс-специфической нуклеазе (ДСН) при транскриптомном анализе *Mycoplasma gallisepticum* [1]. ДСН - это дуплекс-специфичная нуклеаза, выделенная из гепатопанкреаса камчатского краба - термостабильная нуклеаза, обладающая специфичностью к двухцепочечной ДНК. Позднее частная компания Zymo Research выпустила коммерческий набор, также основанный на ферменте ДСН. Данный набор работает на образцах РНК из разных объектов, не внося искажения в представленность транскриптов генов.

Поскольку на данный момент нет оптимизированного протокола приготовления нормализованных библиотек с помощью фермента ДСН для кДНК бактерий *E. coli*, было необходимо подобрать оптимальные условия всех этапов. Для эксперимента была выделена бактериальная РНК из *E. coli* во время экспоненциального роста и эукариотическая РНК из крови человека. Синтезированная кДНК была обработана ферментом ДСН при различных условиях. Для синтеза второй цепи кДНК была использована специальная последовательность олигонуклеотидов, которая позволяет осуществить смену матрицы ввиду особых свойств Mint-ревертазы. Далее полученные фрагменты были подвергнуты этапам лигирования адаптеров для секвенирования и наработке продукта с помощью ПЦР. Готовые библиотеки были визуализированы с помощью электрофореза в агарозном геле и отсеквенированы на платформе MGISEQ-2000.

При сравнении образцов до и после обработки ферментом ДСН было получено, что степень деплеции рРНК составила 80%. Готовые библиотеки бактериальной и эукариотической РНК были оценены по интенсивности свечения в агарозном геле и подготовлены для дальнейшего секвенирования.

Таким образом были подобраны оптимальные условия приготовления библиотек для РНК-секвенирования для прокариотической и эукариотической РНК.

1. Pavel V. Mazin, Gleb Y. Fisunov, Alexey Y. Gorbachev, Kristina Y. Kapitskaya, Ilya A. Altukhov, Tatiana A. Semashko, Dmitry G. Alexeev, Vadim M. Govorun, Transcriptome analysis reveals novel regulatory mechanisms in a genome-reduced bacterium, *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue 21, 1 December 2014, Pages 13254–13268

СОЗДАНИЕ ИЗОГЕННОЙ ПАНЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ SHSY5Y С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ УЧАСТКА ГЕНА *HTT* С РАЗЛИЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ CAG-ПОВТОРОВ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ ГЕНТИНГТОНА

Беликова Л.Д.¹, Островская Ю.А.¹, Лагарькова М.А.¹, Богомазова А.Н.^{1,2}.

1 – Лаборатория клеточной биологии; 2 – Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины.

Обе лаборатории – ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина.

Болезнь Гентингтона (БГ) является орфанным аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием с частотой встречаемости около 5 случаев на 100 тысяч человек. Причиной БГ является экспансия тринуклеотидных CAG-повторов в кодирующей части гена *HTT*, что приводит к возникновению аномально длинного полиглутаминового тракта в белке НТТ. Морфофизиологически патология проявляется гибелью проекционных срединно-шиповых нейронов стриатума и необратимой дегенерацией отдельных областей головного мозга. Одно из основных затруднений в изучении нейродегенеративных патологий, таких как БГ, состоит в сложности получения образцов тканей головного мозга, в связи с чем создание клеточных моделей заболевания для изучения патогенеза и скрининга новых терапевтических агентов является актуальной задачей.

В данной работе для создания клеточной модели БГ мы использовали клеточную линию нейробластомы человека SHSY5Y ввиду ее нейроноподобного фенотипа, возможности быстрого масштабирования, дешевизны культивирования и способности к ограниченной нейрональной дифференцировке. Путем лентивирусной трансдукции нами была получена изогенная панель линий SHSY5Y с повышенной экспрессией фрагмента гена *HTT* (*HTT_{ex1,2,3}*) с разным количеством повторов в составе CAG-тракта (17 CAG, 108 CAG). Регуляция экспрессии фрагмента гена *HTT_{ex1,2,3}* осуществляется при помощи лиганд-индуцибельной системы Tet-ON под действием антибиотиков тетрациклинового ряда, в данном случае доксициклина. Доксициклин в комплексе с белком-трансактиватором (rtTA), связываясь с промотором, включает систему экспрессии целевого фрагмента *HTT_{ex1,2,3}*. Для подтверждения функциональности внесенных кассет была проведена количественная ОТ-ПЦР, в результате которой показано, что при индукции доксициклином экспрессия внесенных фрагментов *HTT_{ex1,2,3} 17Q* и *HTT_{ex1,2,3} 108Q* возрастает в сотни раз по сравнению с клетками без индукции и диким типом.

Клеточная изогенная система с разным количеством CAG-повторов в гене *HTT*, созданная на основе линии SHSY5Y, будет использована для изучения свойств мутантной НТТ-мРНК, поскольку токсичные свойства мРНК с удлиненным трактом CAG-повторов рассматривается в настоящее время как одна из возможных причин развития патогенеза заболевания.

Работа финансировалась из средств гранта Министерства науки и высшего образования № 075–15-2019–1669.

НОВЫЙ ПОДХОД В ИССЛЕДОВАНИИ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУР МИКРОФЛЮИДНЫХ СИСТЕМ НА АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОСЕНСОРОВ

К.А. Прусаков¹, Р.И. Шакуров¹, В.К. Куликова², Е.А. Горланкин¹, Ю.А. Беспятых²,
Д.В. Басманов¹

¹ Лаборатория прикладных биомедицинских микросистем ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

² Лаборатория молекулярной медицины ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Биосенсоры, работа которых основана на образовании специфического молекулярного комплекса на твёрдой поверхности, занимают важное место среди современных аналитических методик. В научных исследованиях широкое распространение получили биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса, а в медицинской практике методика иммуноферментного анализа. Для улучшения аналитических характеристик подобных биосенсоров в научном сообществе активно обсуждается идея их интеграции с микрофлюидными системами. Использование микрофлюидных систем потенциально позволяет увеличить чувствительность, сократить время анализа, а также исключить человеческий фактор. В микрофлюидных биосенсорах сенсорная поверхность расположена на одной из внутренних стенок микрофлюидной реакционной камеры. В простейшем случае сенсорная область представляет собой химически модифицированную поверхность стекла или полимера, на которой создан специфический улавливающий слой. Опыт показывает, что при разработке и проектировании новых сенсоров неизбежно возникают вопросы о том, как форма и размеры сенсорной области влияют на аналитические и прикладные характеристики биосенсора, и как на эти характеристики влияют геометрия микрофлюидной реакционной камеры, скорости и распределение потоков жидкостей внутри неё.

Целью данной работы являлось развитие метода исследования и визуализации влияния структуры микрофлюидной системы на процессы специфической и неспецифической адсорбции на сенсорную поверхность.

Для решения поставленной цели был предложен новый метод проведения эксперимента с помощью биосенсора на фотонном кристалле с двухмерным пространственным разрешением [1]. Данный метод позволяет исследовать различные микрофлюидные системы, изготовленные из полидиметилсилоксана, стекла и различных пластиков. Преимущество данного метода заключается в возможности в реальном времени получать данные о кинетике адсорбции аналитов в различных точках сенсора без необходимости введения в систему дополнительных меток.

С помощью предложенного метода была проведена работа по адаптации геометрии микрофлюидной реакционной камеры с малым отношением глубины камеры к размеру сенсорной области. Полученные результаты могут быть применены при разработке биосенсоров, в которых используются массивы спотов для многопараметрического типирования проб.

Работа по созданию микрофлюидных систем выполнена при поддержке гранта Президента РФ №МК-2988.2022.3.

Работа по разработке биосенсоров для многопараметрического типирования проб выполнена при поддержке гранта поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-10144).

1. Konopsky V.N. et al. Photonic crystal surface mode imaging for multiplexed and high-throughput label-free biosensing. // Biosensors & bioelectronics. 2020. Nov. 15, V. 168, P. 112575.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПОДГОТОВКИ ДНК-БИБЛИОТЕК ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ MGISEQ

Семенов А.А.^{1,2}, Михайлычева М.В.^{1,2}, Горбачев А.Ю.¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Высокопроизводительное секвенирование давно стало одним из основных методов в биологии и медицине. Однако оно все еще остается достаточно дорогим для выполнения рутинных задач. В связи с этим существует необходимость разработки и оптимизации лабораторных протоколов с низкой себестоимостью. Основными этапами создания ДНК-библиотек, которые могут быть оптимизированы, являются: репарация концов ДНК-фрагментов, аденилирование концов (данные этапы можно объединить под единым термином ERAT (англ. End Repair and A-Tailing)), лигирование адаптеров, – служебных последовательностей, содержащих уникальные баркоды для идентификации образца и сайты отжига праймеров, амплификация.

Целью данного исследования была оптимизация лабораторного протокола подготовки ДНК-библиотек и его сравнение с существующим коммерческим протоколом MGI.

Материалы и методы исследования. В качестве исходного материала была использована выделенная ДНК клинического изолята бактерии *E.coli*. После сбора информации из открытых источников и патентов коммерческих компаний были выявлены основные составляющие протокола пробоподготовки, которые затем были проверены и оптимизированы в данным исследованием. В качестве сравнения использовался коммерческий протокол от производителя (MGI Tech). Изменяемые параметры включали в себя: типы адаптеров, условия проведения реакций (время и температура), тип используемой полимеразы, количество этапов ERAT. На вход каждого тестируемого протокола подавалось одинаковое количество материала из одного и того же выделения. Для оценки эффективности отдельных этапов использовались методы спектроскопии, флуориметрии и электрофореза в агарозном геле. В финальном эксперименте представлено девять вариантов протоколов. Ключевые отличия между ними: проведение ERAT в один или два этапа, использование компонентов коммерческого набора MGI или собственно подобранных ферментов, температурный режим работы полимераз, используемые виды полимераз. Полученные таким образом библиотеки были отсеквенированы с помощью DNBSEQ-G400 (MGI Tech, Китай) в режиме парно-концевого чтения с длиной прочтения 150 нуклеотидов (PE150), файлы с прочтениями в формате *.fastq были обработаны согласно стандартному алгоритму работы с геномными данными – оценка качества и фильтрация прочтений, сборка генома (пайплайн сборки Unicycler), выравнивание прочтений на собранный геном с помощью утилиты bwa mem и статистический анализ распределения однонуклеотидных замен, инсерций и делеций, выполненный с помощью разработанных скриптов с использованием языков программирования Python и R. Сравнение библиотек проводилось двумя способами - по выравниванию на бактериальный геном и по выравниванию на плазмиду, для которой последовательность была собрана в полное кольцо.

Результаты. По совокупности критериев (степень эффективности реакций на каждом этапе, количество и состав однонуклеотидных замен на одно прочтение, количество и состав инсерций и делеций, смещения в нуклеотидном составе) были выявлены протоколы-лидеры. Ими оказались те протоколы, где ERAT проводился в два этапа и для амплификации использовалась полимеразы Tersus (Евроген, Россия). Библиотеки, подготовленные с использованием коммерческого набора, показывали высокую эффективность этапов пробоподготовки, а также относительно высокую точность по различным статистикам и использовались как образец для сравнения.

1. MGI Universal DNA Library Prep Set User Manual
2. MGI Exome Universal Library Prep Set User Manual
3. <https://patents.google.com/patent/WO2018090373A1/en?assignee=MGI&oq=MGI+>

IN SILICO ПРЕДСКАЗАНИЕ И АНАЛИЗ НОВЫХ ПРОНИКАЮЩИХ ПЕПТИДОВ

Серебренникова М.Ю., Лацис И.А., Мальцев Д.И., Бочаров Э.В.,
Графская Е.Н., Лазарев В.Н.

Лаборатория генной инженерии

Разработка и изучение новых систем внутриклеточной доставки становятся все более приоритетными задачами в медицинских и фармакологических исследованиях. Благодаря высокой проникающей способности и низкой цитотоксичности проникающие в клетки пептиды (ПП) представляют большой потенциал для создания новых и более эффективных терапевтических методов. Традиционно для поиска новых ПП использовались методы медицинской химии, но с помощью алгоритмов машинного обучения можно значительно ускорить и удешевить этот процесс.

В рамках данного исследования был разработан прогностический алгоритм на основе стэкинга моделей k-ближайших соседей, градиентного бустинга и случайного леса. С его помощью были определены некоторые из предположительно проникающих пептидов, для которых были проведены методы оценки цитотоксичности и проникающей активности. В результате из протеома *Rhopilema esculentum* получен новый низкотоксичный проникающий в клетку пептид CpRE12.

Прежде всего для процедуры обучения были собраны два независимых набора данных, представленных 1186 проникающими и 1212 непроникающими пептидными последовательностями, преимущественно полученными из единой базы данных ПП CPPsite2.0 и открытой базы данных Swiss-prot. Для каждой из них были рассчитаны молекулярные дескрипторы, представление об относительной важности которых получено методом Лассо Тишибрани. Наиболее полно различия между двумя классами определяют 20 численных параметров, в частности, это дескрипторы заряда, атомарного объема молекулы, вторичной структуры, поляризованности, полярности и индекса нестабильности. На следующем шаге с помощью десятикратной перекрестной проверки были протестированы наиболее значимые подмножества параметров выбранных классификаторов. В результате ансамблирования оптимизированных моделей был получен общий прогностический алгоритм, с высокой точностью определяющий проникающие пептиды на валидационной выборке.

Поиск новых пептидов осуществлялся на независимом тестовом наборе данных, состоящем из некоторых доступных протеомов и пептидомов различных организмов. Среди всех последовательностей, определенных алгоритмом как проникающие, случайным образом были выбраны семь кандидатов с одними из лучших прогнозируемых характеристик. Далее они были химически синтезированы твердофазным методом. Последующая оценка их цитотоксических свойств показала, что ни один из них не препятствует жизнедеятельности клеток. С использованием конфокальной микроскопии было показано, что один из меченых отобранных пептидов способен транслоцироваться в клетки мышинных фибробластов. Это пептид CpRE12 (SYQWQIFYRSLDGSGAKE) из организма медузы вида *Rhopilema esculentum*. В заключение, с помощью ЯМР-анализа была получена его предположительная пространственная структура со стабильной короткой спиральной областью на N-конце и неупорядоченной структурой на C-конце.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 23-15-00084)

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОТЕОГЕНОМНОГО ПРОФИЛЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *Mycoplasma hominis* С ФЕНОТИПОМ ИХ КОЛОНИЙ

Сикамов К.В.^{1,2}, Побегуц О.В.¹, Галямина М.А.¹ Уразаева Д.Р.^{1,2}, Авшалумов А.С.^{1,2}, Михайлычева М.В.^{1,2},
Бабенко В.В.¹, Смирнов И.П.¹, Горбачев А.Ю.¹

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

²Московский физико-технический институт (НИУ), Москва

Введение. *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) относится к классу Молликут, для которых характерны очень маленький размер генома, редукция метаболических путей, в том числе транскрипционных факторов, а также отсутствие клеточной стенки. Несмотря на это они прекрасно адаптируются не только к определенным нишам в организме хозяина, но могут распространяться по организму, населяя различные органы и ткани. Актуальность изучения *M. hominis*, и в частности клинических изолятов, обуславливается ее онкогенными свойствами, а именно ее способностью активировать миграцию и инвазию опухолевых клеток.

Цель. Провести сравнительный анализ фенотипа и протеогеномного профиля 8 клинических изолятов *M. hominis*, полученных от пациентов с урогенитальными инфекциями, и лабораторного штамма Н-34.

Методы. В работе использовали лабораторный штамм *M. hominis* Н-34 и 8 клинических изолятов *M. hominis*, полученных из биологического материала больных урогенитальными инфекциями. Секвенирование геномов проводили на секвенаторе MGISEQ-2000 для коротких прочтений и на секвенаторе PromethION для длинных прочтений. Для сборки геномов использовали биоинформатический конвейер Unicycler. Геномы аннотировали с помощью Vakta и BLAST. Протеомный анализ проводили с помощью ВЭЖХ-масс-спектрометрии с использованием системы Ultimate 3000 RSLC nano HPLC, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive Plus. Количественное определение и идентификация белков выполнялись с помощью NextFlow конвейера QuantMS против базы данных на основе генома лабораторного штамма Н-34. Для визуализации и постобработки протеогеномных данных использовался написанный на языке программирования R скрипт, доступный по ссылке на GitHub (https://github.com/Sikamov/M.hominis_2023).

Результаты. Показано, что клинические изоляты *M.hominis* четко разделяются по фенотипу: одни из них формируют *типичные* для лабораторного штамма *M.hominis* Н-34 колонии размером 250-350 мкм (Тс) и характеризуются быстрой скоростью роста, другие - *нетипичные* (нТс), отличаются очень маленьким размером колоний (менее 30 мкм) и медленным ростом. Анализ геномных данных, а именно наличие мобильных элементов, однонуклеотидных замен (SNP) по всему геному, SNP в генах метаболизма, сравнение последовательности генов мембранных белков и элементов систем рестрикции-модификации I типа (RMI) показал, что исследуемые штаммы также четко разделяются в соответствии с их фенотипическими признаками. Протеомный профиль определившихся белков в клинических изолятах *M. hominis* и лабораторном штамме Н-34 также коррелирует с фенотипом колоний и скоростью роста.

Выводы. Сравнительный протеогеномный анализ клинических изолятов *M. hominis* и лабораторного штамма Н-34 показал, что исследуемые штаммы можно точно разделить на две группы, строго связанными с их фенотипом: Тс и нТс. Различия, которые обуславливают данную кластеризацию клинических изолятов *M. hominis* и лабораторного штамма Н-34, могут быть объяснены процессами, связанными с адаптацией в стрессовых условиях организма хозяина.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИБЛИОТЕК ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ MGISEQ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ТРАНСКРИПТОВ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Сикамов К.В.^{1,2}, Уразаева Д.Р.^{1,2}, Горбачев А.Ю.¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Введение. Репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR) может играть ключевую роль в диагностике и разработке потенциальных методов лечения различных аутоиммунных, онкологических и других заболеваний, в борьбе против которых критическую роль играют Т-клетки с уникальными последовательностями в регионе CDR3 мРНК, ассоциированными с данным заболеванием.

Цель. Оптимизировать методику приготовления кДНК библиотек для секвенирования последовательностей транскриптов Т-клеточных рецепторов (TCR секвенирования), адаптированную для платформы MGISEQ.

Методы. Мононуклеарные периферические клетки крови (PBMCs, включающие лимфоциты) выделялись при помощи центрифугирования в градиенте плотности фиколла. РНК из PBMCs была выделена тризольным методом. Синтез кДНК на матрице выделенной РНК осуществлялся при помощи Mint-ревертазы (“Евроген”). Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) была применена для оценки влияния различных условий на синтез кДНК, в том числе: (1) использование ДНКазы; (2) использование двух видов TSO – с одним LNA-G на конце и без этой модификации; (3) температуры работы ревертазы и гибридизации праймера для построения первой цепи кДНК, момент ввода TSO праймера; (4) использование агентов, повышающих локальную плотность реагентов смеси (crowding) – полиэтиленгликоль (PEG 8000, PEG 4000) и IP-resolution (“Евроген”). Для подбора оптимальных температур гибридизации праймеров были поставлены градиентные ПЦР для первого и второго раундов. Для увеличения количества нарабатываемого целевого продукта и снижения – неспецифических продуктов ПЦР, на втором раунде были поставлены ПЦР с разными временами денатурации, гибридизации и элонгации для сравнения влияния этих параметров на финальную концентрацию получаемой библиотеки транскриптов TCR. Готовые библиотеки секвенировались на платформе MGISEQ-2000 с использованием режима для парноконцевых прочтений длиной 150 нуклеотидов (PE-150).

Результаты. Для исследования клонотипов Т-клеток в образцах периферической крови человека была разработана панель для целевого обогащения кДНК последовательностями генов Т-клеточных рецепторов для технологии секвенирования MGISEQ, основанная на панели *Mamedov et al.* [1], методика реализации которой была оптимизирована в данной работе. В ходе оптимизации протокола TCR секвенирования было показано, что для наиболее эффективного выделения РНК из PBMCs необходимо нагревать лизат клеток и тризола до 37 °С в течении 30 мин, а на стадии переосаждения РНК изопропанолом инкубировать в течение ночи при -20 °С. На этапе синтеза кДНК среди всех опробованных условий только crowding-агенты позволяют снизить (в 1,5 раза) массу используемой РНК матрицы на входе, без потери массы кДНК на выходе, остальные условия не влияли на эффективность синтеза кДНК. На завершающих этапах протокола, были оптимизированы (1) температуры гибридизации *in silico* подобранных праймеров для обеих – TCR α и TCR β цепей; (2) для второго раунда ПЦР, во время которого вводятся технические последовательности (адаптеры для секвенирования образцов на платформе MGISEQ-2000) с использованием праймеров со “свисающими концами”, подобраны времена денатурации, гибридизации и элонгации; (3) оптимизировано количество циклов всех трех раундов ПЦР. Результаты секвенирования указывают на то что полученные прочтения картируются на последовательности генов TCR. Разнообразие клонотипов – количество Т-клеток с уникальной последовательностью CDR3 равно 5323 для TCR α и 3827 для TCR β .

Выводы. Была оптимизирована и реализована адаптированная для платформы MGISEQ методика приготовления транскриптомных библиотек для TCR секвенирования, позволяющая проводить дальнейшие исследования в области диагностики и выявления терапевтических мишеней различных заболеваний, ассоциированных с репертуаром TCR.

Список использованных источников: 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.

ДЕНДРИМЕРЫ ПОЛИАМИДОАМИНА КАК МАТЕРИАЛ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКРЫТИЙ ДЛЯ БИОСЕНСОРА НА ПОВЕРХНОСТНЫХ ОПТИЧЕСКИХ ВОЛНАХ В ФОТОННОМ КРИСТАЛЛЕ

Шакуров Р.И.¹, Сизова С.В.¹, Дудик С.П.¹, Бажутов М.Н.¹, Ширшиков Ф.В.²,
Беспятых Ю.А.², Басманов Д.В.¹.

¹ Лаборатория прикладных биомедицинских микросистем ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

² Лаборатория молекулярной медицины ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Использование биосенсора на поверхностных волнах для детекции взаимодействий малых биомолекул, таких как, например, олигонуклеотиды или РНК, имеет ряд преимуществ по сравнению с методами, использующими введение метки для визуализации процесса взаимодействия. В частности, введение меток может приводить к конформационным изменениям, и, следовательно, к изменению биохимической активности молекулы. Детекция таких олигонуклеотидов может быть важной, как в диагностических целях (например, сполиготипирование возбудителя туберкулеза), так и для потенциальной разработки лекарственных препаратов.

В данной работе изучена модификация поверхности фотонного кристалла (ФК) с помощью сверхразветвлённых полимеров – дендримеров полиамидоамина (ПАМАМ). За счёт взаимодействия терминальных аминок групп ПАМАМ 4-го поколения с карбонильными группами глутарового альдегида на поверхности ФК формируется разветвленная структура, способная значительно увеличить сорбционную емкость поверхности. Так, для такого объекта как бычий сывороточный альбумин, достигнуто увеличение сорбционной емкости в 15 раз, по сравнению с планарной поверхностью, модифицированной 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС).

Другим объектом исследования были олигонуклеотидные зонды, обеспечивающие дифференциальную диагностику возбудителя туберкулеза. Для данного анализа достигнуты предел обнаружения в концентрации 20 пг/мл и предел количественного определения 70 фМ [1]. Полученные покрытия охарактеризованы методом атомно-силовой микроскопии в жидкой фазе.

Работа по разработке биосенсоров для многопараметрического типирования проб выполнена при поддержке гранта поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-10144).

1. Shakurov R., Sizova S., Dudik S., Serkina A., Bazhutov M., Stanaityte V., Tulyagin P., Konopsky V., Alieva E., Sekatskii S., Bespyatykh J., Basmanov D. / Dendrimer-Based Coatings on a Photonic Crystal Surface for Ultra-Sensitive Small Molecule Detection // Polymers (2023), 15(12), 2607.

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ БЕЛКОВ – МАРКЕРОВ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19

Шанский Я.Д., Господарик А.В., Серкина А.Н., Комарова А.В., Есиев С.С., Беспярых Ю.А.

Лаборатория молекулярной медицины

Актуальность. Связь аминопептидазы P2 (XPNPEP2), кофактора гепарина II (SERPIND1), активируемого гипоксией белка 1 (HYOU1), цАМФ-зависимого транскрипционного фактора, активируемого во время голодания и влияющего на метаболизм (CREB3L3), аполипопротеина A1 (APOA1), кубилина (CUBN) с патофизиологией новой коронавирусной инфекции показана в ряде исследований. Однако связь антител к данным факторам с течением COVID-19 не прояснена.

Цель работы заключалась в количественном определении в моче и сыворотке крови пациентов с различным течением COVID-19 антител к белковым биомаркерам (anti-SERPIND1, anti-APOA1, anti-CUBN, anti-XPNPEP2, anti-HYOU1, anti-CREB3L3) с оценкой их диагностической значимости.

Материалы и методы. К исследованию были привлечены пациенты, которым был поставлен диагноз «новая коронавирусная инфекция». Методом рандомизации из них были выбраны две подгруппы: с легким течением, которым не потребовалась госпитализация ($n=40$), и с тяжелым течением, подвергшиеся госпитализации и интенсивной терапии ($n=40$). У всех пациентов мочу и сыворотку крови отбирали при поступлении и при начале интенсивной терапии (тяжелое течение) или выписке (легкое течение). Метод определения – количественный иммуноферментный анализ на сорбенте с использованием коммерческих наборов реагентов (CloudClone, Corp., и BlueGene Biotech, Китай). Образцы анализировали в соответствии с инструкцией производителя на автоматическом анализаторе Lazurite (Dynex, США).

Результат и выводы. Показано сильное варьирование уровня изученных биомаркеров, наиболее выраженное в моче и в меньшей степени – для сыворотки крови. Уровень антител к белковым биомаркерам в моче у пациентов не различался значимо для обеих групп пациентов. В сыворотке крови пациентов отмечались значимые различия в уровне anti-APOA1 (p 0.0094) и anti-XPNPEP2 (p 0.027). Методом главных компонент показано, что уровень антител к белковым биомаркерам в сыворотке крови позволяет разграничить группы пациентов с тяжелым и более легким течением COVID-19 при их сочетанном использовании (покрытие 52,4% общей дисперсии в пространстве первых двух главных компонент). Разработанная линейная регрессионная модель показала хорошие прогностические параметры (AUC 0.870, чувствительность 0,823, специфичность 0,781 при использовании 6 маркеров); методом опорных векторов на тестовой выборке показана достаточно большая точность предсказательной модели (0,833). Наиболее подходящим анализом является сыворотка крови, поскольку в моче тяжелобольных часто присутствуют слущенный эпителий, оксалаты, назначаемые в ходе терапии лекарственные средства, что может влиять на содержание целевых белков в биологической жидкости и, соответственно, точность анализа.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам МГМСУ им. А.И. Евдокимова О.О. Янушевичу, И.В. Маеву, Н.И. Крикелли, О.В. Левченко, А.В. Заборовскому, В.В. Евдокимову, А.А. Солодову, П.А. Белому, Д.Н. Андрееву, Ф.С. Соколову, А.К. Фоменко, М.К. Девкоте, С.В. Царегородцеву за помощь в организации и проведении исследования.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2 И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНСЕРВАТИВНОСТИ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ЕГО ДИАГНОСТИКИ

Ширшиков Ф. В., Беспятых Ю. А.

Лаборатория молекулярной медицины

Использование консервативных генов в молекулярной диагностике этиологических агентов инфекционных заболеваний критично для продолжительного срока применимости конкретной тест-системы, поскольку новые нуклеотидные замены в геноме патогенов снижают её исходные аналитические параметры. В частности, быстрая эволюция РНК-содержащих вирусов и явление квазивидов способствуют появлению и сохранению в вирусной популяции ряда генетических линий, что наглядно было продемонстрировано на протяжении всей пандемии COVID-19. При этом все эти линии, сменяя друг друга, являлись причиной одного и того же заболевания, следовательно при разработке новых тест-систем актуально использование надёжной мишени, которая в наименьшей степени будет накапливать изменения в своей нуклеотидной последовательности. Данный аспект важен и с точки зрения возможного появления новых видов бетакоронавирусов.

В данной работе был проведён ретроспективный анализ полных геномов коронавируса SARS-CoV-2, доступных в базах данных GISAID (<https://gisaid.org>) и на аналитической платформе COVID CG (<https://covidcg.org>), с целью оценки нуклеотидной изменчивости различных генов в период с 15.12.2019 по 01.09.2022. В исследуемую выборку включено более 10 млн штаммов, депонированных из различных стран мира, а также первый референсный геном SARS-CoV-2.

В результате проведённого анализа все исследованные гены были ранжированы по количеству накопленных и закреплённых в популяции нуклеотидных замен и делеций. Координаты всех нуклеотидных замен были картированы на референсный геном SARS-CoV-2 с помощью одного из модулей программы MorphoCatcher (<http://morphocatcher.ru>). Полученные данные свидетельствуют о том, что мишени, предлагаемые ранее экспертами Всемирной организации здравоохранения для диагностики коронавируса SARS-CoV-2, такие как гены N, E, S и RdRp (Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. WHO, 2020), не являются консервативными мишенями для разрабатываемых праймеров и успели накопить множество замен и протяжённых делеций. Наиболее консервативным геном является ген неструктурного белка nsr16, который ранее не рассматривался в качестве мишени для диагностики.