



ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРА СПЛАЙСИНГА И ПРЕПАРАТА, ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДНК, НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

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

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Дисрегуляция альтернативного сплайсинга (АС) является характерной особенностью раковых клеток. Во многих работах была показана взаимосвязь между АС и возникновением химиорезистентности [1]. В связи с этим ингибиторы сплайсосомы имеют большой потенциал в противоопухолевой терапии, однако I фаза клинических испытаний выявила высокую токсичность этих соединений для организма. Ранее нами было показано, что наномолярные концентрации ингибитора сплайсинга PI-V, не оказывающие значительного влияния на жизнеспособность клеток, повышают чувствительность различных раковых линий к традиционному химиопрепарату цисплатину [1]. Однако механизмы, объясняющие наличие сильного синергетического эффекта этих препаратов, остаются неясными. Для выяснения механизма синергии препаратов был проведен протеомный анализ клеток аденокарциномы яичника SKOV3 после воздействия PI-V, цисплатина, а также их комбинации. В ответ на цисплатин в клетке повышалась представленность белков, участвующих в процессах репарации ДНК и регуляции клеточного цикла, тогда как при действии цисплатина и PI-V, наоборот, наблюдалось понижение представленности белков, участвующих в этих процессах. Поскольку обработка клеток только PI-V не приводила к значительным изменениям в протеоме, мы исключили вероятность нарушения сплайсинга мРНК, продукты которых участвуют в репарации ДНК. Возможно, синергия препаратов обусловлена неканоническими функциями сплайсинговых факторов, связанными с репарацией ДНК и поддержанием стабильности генома. Далее с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания на маркер ДНК-повреждения γ H2AX, было показано, что клетки, обработанные комбинацией препаратов, демонстрировали более слабый сигнал фосфорилирования H2AX. Это может быть связано с тем, что PI-V либо угнетает репликацию, и делает клетки более восприимчивыми к цисплатину, либо нарушает мечение двухцепочечных разрывов ДНК, либо приводит к аресту клеточного цикла. Обнаруженный синергетический эффект мог бы позволить снизить терапевтические дозы препаратов и избежать побочных эффектов препаратов – ингибиторов сплайсинга.

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

Литература

1. Anufrieva K.S. et al. // *Genome Medicine*. 2018. №10. P.49.



ОСОБЕННОСТИ ФОТОМОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ СЕДЫХ И ПИГМЕНТИРОВАННЫХ ВОЛОС ЧЕЛОВЕКА

М.В. Васильцова

Лаборатория физико-химических методов исследования и анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Волос человека состоит преимущественно из кератинов, которые обеспечивают его механическую прочность и участвуют во взаимодействии с факторами среды. Низкомолекулярные кератин-ассоциированные белки образуют пул растворимых белков (РБ) стержня волоса и различаются между собой содержанием ароматических аминокислот и цистина/цистеина. Ранее мы показали, что в результате облучения волос УФ светом возрастает содержание тиолов во фракции РБ седых волос, что подтверждалось данными Рамановской спектроскопии поперечного среза волоса [1]. Целью настоящего исследования был сравнительный анализ РБ седых и пигментированных волос, облученных в лабораторных условиях. Объектом исследования служили седые и пигментированные волосы 15 здоровых добровольцев в возрасте 45–70 лет, без искусственного окрашивания. Исходно в седых волосах обнаружилось повышение содержания тиолов в РБ седых волос на 50% по сравнению с пигментированными волосами ($p < 0,05$ по критерию Уилкоксона). Под действием УФ-С происходило увеличение содержания РБ на 23% в пигментированных и на 45% в седых волосах, при этом содержание тиолов в этих белках увеличивалось одинаково на 36% ($p < 0,01$). В результате после облучения седые волосы отличались от пигментированных по содержанию РБ и тиолов в РБ.

Таким образом, показатель «содержание тиолов в РБ» позволяет оценивать эффекты УФ света как в образцах седых, так и в образцах пигментированных волос. Наиболее вероятный механизм образования тиолов – фотоиндуцированное разрушение SS- связи цистеина, участвующих в образовании внутри- и межбелковых связей в стержне волоса.

Литература

1. Fedorkova M.V., Brandt N.N., Chikishev A.Y., Smolina N.V., Balabushevich N.G., Gusev S.A., Lipatova V.A., Botchey V.M., Dobretsov G.E., Mikhailchik E.V.: Photoinduced formation of thiols in human hair// *J Photochem Photobiol B.*, 2016,164, 43-48.



ГЕННЫЕ ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММА *B. LONGUM* GT15 К ФАКТОРАМ ИММУННОГО ОТВЕТА

В.А. Веселовский, М.С. Дьячкова, Д.А. Беспятых, Е.И. Олехнович, Т.А. Семашко, К.М. Климина
Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Комменсальные микроорганизмы являются наиболее значимым компонентом кишечной микробиоты, принимающие участие в формировании симбиотических взаимоотношений с организмом хозяина. Комменсальная микробиота кишечника выполняет ряд важных физиологических функций в организме хозяина, включая иммунную и моторную функции, обеспечение целостности эпителиального барьера, расщепление сложных полисахаридов и синтез витаминов. Среди анаэробных комменсальных микроорганизмов бифидобактерии являются наиболее ранними колонизаторами. Механизмы, обеспечивающие выживание комменсальных микроорганизмов в условиях воспалительного процесса и постоянство репертуара нормальной микробиоты кишечника, на сегодняшний день остаются малоизученными. Мы предлагаем новый подход для изучения механизмов устойчивости бифидобактерий к факторам иммунного ответа, основанный на применении высокопроизводительного секвенирования с последующим анализом транскриптома, поиском дифференциально экспрессирующихся генов и точек старта инициации транскрипции в условиях воздействия провоспалительных цитокинов по сравнению с нормальными условиями.

Нами было изучено влияние цитокинов IL-6 и TNF α в различных концентрациях на рост штамма *B. longum* GT15. Показано, что IL-6 в концентрации 0,1 нг/мл и TNF α в концентрации 10 нг/мл замедляют рост штамма. В результате транскриптомного анализа обнаружено, что TNF α вызывал более значительные изменения экспрессионом профиле, чем IL-6. Для штамма *B. longum* GT15, выращенного с IL-6 обнаружено 130 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), включая 68 гена с пониженной регуляцией и 62 гена с повышенной регуляцией; с TNF α обнаружено 1017 ДЭГ, среди которых 505 генов были пониженной регуляцией, а 512 генов с повышенной регуляцией. Функциональный анализ показал, что при воздействии цитокина TNF α , экспрессируются в основном гены, включенные в энергетические пути. Это может быть связано как с накоплением ресурсов в условиях воспалительного процесса, так и поддержанием гомеостаза клетки путем активации АТФ зависимых АВС транспортеров. Воздействие цитокина IL-6 никак не влияет на общую картину работы разных функциональных групп. С помощью филогенетического профайлинга были установлены эволюционно стабильные группы ДЭГ и подтверждена их оперонная организация при помощи анализа точек старта транскрипции. Таким образом, в данном исследовании мы предсказали гены, вовлеченные в предполагаемый сигнальный путь, лежащий в основе механизмов устойчивости к воспалительным факторам у бифидобактерий. Поскольку бифидобактерии являются одним из основных компонентов микробиоты кишечника человека, проявляя выраженные противовоспалительные свойства, данное исследование имеет большое практическое и научное значение. *Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-74-00146).*

Литература

1. Veselovsky VA, Dyachkova MS, Menyaylo EA, Polyayeva PS, Olekhovich EI, Shitikov EA, Bespiatykh DA, Semashko TA, Kasianov AS, Iliina EN, Danilenko VN, Klimina KM. Gene Networks Underlying the Resistance of *Bifidobacterium longum* to Inflammatory Factors. *Front Immunol.* 2020 11:595877.



ИММУННЫЕ БЕЛКИ *BACTEROIDES FRAGILIS*

А.А. Внукова, Н.Б. Захаржевская

Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Активация кворум-сенсинга в условиях конкурентной борьбы позволяет бактериям наиболее эффективно отвечать на воздействие со стороны конкурирующего вида посредством иммунных белков, что было описано в том числе для Enterobacteriaceae [1, 2]. Род *Bacteroides* оказывают ингибирующее действие на его патогенных представителей с помощью выброса пар сопряжённых белков эффекторов и иммунных белков [3]. Основной задачей нашего исследования являлось определение способа доставки белков *Bacteroides fragilis* до клеток-мишеней, а также определение потенциального участия белков данного типа в явлении кворум-сенсинга популяции.

Методами сравнительного полногеномного секвенирования клинических изолятов *Bacteroides fragilis*, были выявлены участки генома, кодирующие белки-эффекторы и иммунно-протекторы. Для анализа белков были получены препараты клеточных лизатов, бесклеточной среды и везикул, которые были визуализированы при помощи ПЭМ и подготовлены для протеомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. На основе данных протеономного профилирования были составлены базы триптических пептидов для идентификации целевых белков.

Согласно полученным данным, только в составе препарата везикул были выявлены белки иммунной защиты, дающие преимущество виду в конкурентной борьбе. Была высказана гипотеза о распределении белков иммунной защиты посредством везикул у токсигенного штамма *Bacteroides fragilis* внутри популяции для своевременного ингибирования белков-эффекторов.

Список использованной литературы

1. Deng Z. et al. Quorum Sensing, Biofilm, and Intestinal Mucosal Barrier: Involvement the Role of Probiotic // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020. № September (10). С. 1–10.
2. Bivar Xavier K. et al. Bacterial interspecies quorum sensing in the mammalian gut microbiota // *Comptes Rendus – Biologies*. 2018. № 5 (341). С. 297–299.
3. Zakharzhevskaya N. B. et al. Interaction of *Bacteroides fragilis* toxin with outer membrane vesicles reveals new mechanism of its secretion and delivery // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017. № 2 (7).



МУЛЬТИОМИКСНЫЙ АНАЛИЗ ADAR-ОПОСРЕДОВАННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ мРНК

А.О. Гончаров, А.А. Ключникова, Л.И. Левицкий*, К.Г. Кузнецова, М.С. Кухарский**,
М.А. Лагарькова***, С.А. Мошковский

Лаборатория протеогеномики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

**ФИЦ ХФ РАН*

***РНМУ им. Н.И. Пирогова*

****Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА*

Среди различных видов редактирования РНК наиболее распространенным является преобразование аденозина в инозин в двухцепочечных структурах РНК. Такое редактирование осуществляют ферменты семейства ADAR, которые катализируют гидролитическое дезаминирование аденозина в инозин. Событие редактирования в кодирующих областях может изменять информационное значение мРНК, поскольку образующийся инозин распознаётся рибосомальной системой как гуанозин. В случае несинонимичной замены основания в мРНК транслирующийся белок будет иметь аминокислотную последовательность, отличную от закодированной в геноме.

Для идентификации продуктов таких замен в протеомах мозга человека и мыши мы использовали общедоступные наборы данных LC-MS/MS протеома мозга и базы данных, дополненные аминокислотными последовательностями белков, которые получаются в результате редактирования кодирующей их мРНК. Такой протеогеномный подход позволил идентифицировать 20 сайтов редактирования в белках головного мозга мыши, принадлежащих 14 генам, и 37 сайтов из 32 генов у человека. Обнаружено, что восемь участков редактирования перекрываются между образцами мозга человека и мыши. Для каждого из этих сайтов получали изотопно меченные пептиды, геномный и перекодированный для таргетного количественного анализа на масс-спектрометре типа тройного квадруполь. Уровень редактирования сайтов на белковом уровне измеряли в мозжечке и коре больших полушарий у трех линий трансгенных мышей с моделями нейродегенеративных заболеваний. Доля перекодирования варьировала от 100%, например, для продуктов генов *GRIA3* и *CYFIP2*, до менее чем 10% для *СОРА* и *CADPS*.

В настоящий момент идет работа по изучению уровня редактирования в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) и нейронах, происходящих из ИПСК. Культуры были получены из соматических клеток пациентов, страдающих от некоторых наследственных болезней экспансии тринуклеотидных повторов, в частности хорее Гентингтона. Используя протеогеномные и транскриптомные методы, мы надеемся установить взаимосвязь между изменением в уровне редактирования РНК и патогенезом этих заболеваний.



ПРОФИЛИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОРНК ПЛАЗМЫ У ПАЦИЕНТОВ СО СТАБИЛЬНОЙ ИБС (СИБС) И ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ (ОКС)

А.В. Желанкин, Д.А. Стоногина, С.В. Васильев, К.Ю. Бабалян, Е.И. Шарова, Ю.В. Долудин,
Э.В. Генерозов, Д.Ю. Щекочихин, А.С. Аксельрод

Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Цель исследования: изучение изменений в профиле внеклеточных циркулирующих микроРНК плазмы, вовлеченных в патогенез атеросклероза, у пациентов с наличием СИБС или ОКС по сравнению с контрольными группами участников без ИБС.

Материалы и методы. В исследование было включено 136 участников: 50 пациентов с наличием ОКС, включая подгруппы из 24 пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) и 26 пациентов с нестабильной стенокардией (НС); 26 пациентов с СИБС; 30 участников исследования с неосложненной гипертонической болезнью 1-2 степени (ГБ) без ИБС; 30 условно здоровых лиц (УЗЛ). Были получены образцы плазмы крови участников исследования, и из них были выделены образцы внеклеточных циркулирующих микроРНК (ц-микроРНК). Относительные уровни восьми кандидатных ц-микроРНК плазмы (miR-126-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-375-3p и miR-92a-3p) были измерены с помощью количественной ПЦР по методике TaqMan miRNA Advanced с нормированием на эндогенную референсную микроРНК miR-16-5p.

Результаты. Относительные уровни ц-микроРНК miR-21-5p и miR-146a-5p были повышены более чем в 2 раза у пациентов с ОКС по сравнению с участниками с ГБ и УЗЛ, и примерно в 2 раза по сравнению с пациентами с наличием СИБС ($p < 0,05$). Уровни этих же микроРНК были повышены в 1,2-1,5 раза у пациентов с СИБС по сравнению с контрольными группами без ИБС ($p < 0,05$). Относительный уровень ц-микроРНК miR-17-5p был снижен более чем в 2 раза у пациентов с СИБС и ОКС по сравнению с УЗЛ, и в ~1,6 раз по сравнению с участниками с ГБ ($p < 0,05$). Уровень ц-микроРНК miR-375-3p в плазме был более чем двукратно понижен при ОКС только по сравнению с УЗЛ ($p < 0,05$). Для указанных ц-микроРНК не было обнаружено различий внутри группы пациентов с ОКС при сравнении подгрупп с НС и ОИМ.

Выводы. В изученной выборке повышенные уровни циркулирующих внеклеточных микроРНК плазмы miR-21-5p и miR-146a-5p являлись маркерами ИБС, при этом существенное повышение (более чем в 2 раза) было характерно для ОКС, а умеренное повышение – для СИБС. Сниженный уровень miR-17-5p являлся маркером СИБС и ОКС.



ДИНАМИКА СТРУКТУРЫ НУКЛЕОИДА *Mycoplasma gallisepticum* В ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ И СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗАХ РОСТА

А.И. Зубов, О.В. Побегуц, М.А. Галямина, В.А. Манувера, Н.А. Баринов, Д.В. Клинов,
Г.Ю. Фисунов

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Структура и динамика бактериального нуклеоида играет важную роль в регуляции экспрессии генов. Бактерии класса Молликут и, в частности, микоплазмы, обладают крайне малым размером генома. У них отсутствует целый ряд как структурных белков нуклеоида, так и регуляторов экспрессии генов. Мы изучили организацию нуклеоида *M. gallisepticum* в стационарной и экспоненциальной фазах роста на структурном уровне и уровне протеома. Смена фазы роста приводит к структурной реорганизации нуклеоида, в частности, происходит его конденсация и смена белкового состава. Наблюдаемые изменения согласуются с обнаруженными ранее изменениями в *M. gallisepticum* на транскриптомном уровне во время смены фазы роста. Помимо этого, мы установили, что гликолитический фермент енолаза выполняет также функции структурного белка нуклеоида в этой бактерии. Он способен неспецифично присоединяться к ДНК и может образовывать с ней фибриллоподобные комплексы.



ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КОНЕЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЧРЕЗВЕРТЕЛЬНОГО ПЕРЕЛОМА БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Д.А. Зюзин¹, В.Э. Дубров², И.А. Кузькин³, И.М. Щербаков²

¹Травматологическое отделение ФНКЦ ФХМ ФМБА

²Кафедра ОиСХ ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова

³ООО "Неха"

В связи с развитием динамического остеосинтеза, особую важность приобретает анализ процессов, происходящих в костной ткани в ходе заживления переломов в условиях постоянных перемещений элементов системы «кость-имплантат». С целью улучшения результатов лечения повреждений проксимального отдела бедренной кости (ПОБК), в связи с необходимостью оценки влияния металлофиксаторов на биомеханику зоны повреждения и невозможностью натуральных экспериментов, было проведено математическое моделирование с применением метода конечных элементов чрезвертельного перелома бедренной кости в условиях фиксации динамическим цефаломедулярным штифтом. К созданной модели была приложена нагрузка весом тела человека 80 кг, оценено напряженно-деформированное состояние системы «кость-имплантат». Результаты моделирования с использованием МКЭ показали высокую эффективность метода для решения прикладных задач травматологии и ортопедии в условиях динамических нагрузок системы «кость-имплантат». С учетом проведенного исследования в травматологическом отделении проведено оперативное лечение 43 пациентов за 2020 год. Осложнений не выявлено. Таким образом, результаты математического моделирования с использованием МКЭ позволяют прогнозировать перемещение костных фрагментов сломанного сегмента скелета, правильно выбрать метод остеосинтеза отломков и оценить последствия этого остеосинтеза.

Литература

1. Ковалевская Д.В., Боблак О.Н., Яблоков С.В., Стрельченко Е.А., Овчинников И.А. Компьютерные технологии для биомеханического анализа остеосинтеза переломов проксимального отдела бедра // *Известия ЮФУ*, 2009. — № 9. С.98-102.
2. Geramy A., Hassanpour M., Emadian Razavi E.S. Asymmetric Outer Bow Length and Cervical Headgear Force System: 3D Analysis Using Finite Element Method. // *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*. 2015. № 3 (12). С. 216–225.
3. Dan Dragomir-Daescu, Asghar Rezaei, et al. Proximal Cadaveric Femur Preparation for Fracture Strength Testing and Quantitative CT-based Finite Element Analysis // *J Vis.* — 2017 T. 121 — С. 54925.



ЛИПИДНАЯ НАНОТРУБКА – МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЙ СЕНСОР ОДИНОЧНЫХ БЕЛКОВ И БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

К.А. Иванова, А.М. Варижук, Г.Е. Позмогова, П.В. Башкиров

Лаборатория электрофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Сенсоры на основе нанопор обладают огромным потенциалом в качестве инструмента для исследования одиночных молекул за счет высокой чувствительности, универсальности и простоты подхода, который заключается в измерении скачков ионного тока, вызванных частичным перекрытием просвета нанопоры молекулой аналита. Этот метод позволяет находить диаметр, дипольный момент, заряд молекул и динамику их преобразования в микро- или наносекундном масштабе времени. В данной работе мы предлагаем метод создания мультимодального сенсора одиночных молекул на основе цилиндрической липидной нанотрубки (НТ). За счет эластичных свойств стенки НТ становится возможной регистрация не только прохождения молекул внутри канала НТ, но и адсорбции одиночных молекул белков на ее наружной поверхности, что значительно расширяет функциональность такого сенсора по сравнению с твердотельными аналогами.

В ходе выполнения работы было проведено параметрическое исследование характеристик шума измеряемого ионного тока при различных значениях длины НТ, ионной силы электролита и ширины полосы пропускания сигнала. Было определено значение константы Хуга для $1/f$ шума (3×10^3), которая оказалась на порядок больше, чем для твердотельных нанопор¹, что может объясняться эластичностью НТ. Несмотря на большой $1/f$ шум, теоретически и экспериментально доказана возможность детектирования изменения геометрии НТ длиной 100–180 нм при адсорбции на поверхности одиночных молекул белка, если время взаимодействия белка и НТ составляет более 1 мс.

Кроме того, был предложен подход регистрации одиночных молекул внутри просвета липидной НТ. Был использован молекулярный конструктор – связывающийся с белком ДНК-аптамер, модифицированный холестерином, удерживающим ДНК у мембраны. В итоге, было показано, что регистрация отдельных событий становится возможной при совпадении поперечных размеров просвета НТ и радиуса гирации белка.

Литература

1. Smeets R.M.M. [et al.] Noise in solid-state nanopores // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105, No 2. P. 417–421.



ЛИПИД-БЕЛКОВЫЙ СИНЕРГИЗМ В МОРФОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Д.В. Ивченков, А.М. Варижук, И.А. Лацис, В.Н. Лазарев, П.В. Башкиров

Лаборатория электрофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Липидный бислой в клетке – это сложная динамическая система, чьи свойства, геометрия и состав постоянно меняются [1]. Механизмы морфогенеза клеточной мембраны крайне многообразны. Они включают в себя полимеризацию специализированных белков на поверхности мембраны (кавеолин, клатрин, динамин), прикладывание точечной силы перпендикулярно поверхности мембраны (актин, различные белковые моторы) [2], а также механизм «краудинга» белков, адсорбирующихся на поверхности мембраны [3]. Для ряда периферийных белков, в том числе и домена ENTH белка эпсина человека было показано, что стерическое взаимодействие между отдельными молекулами белка на поверхности мембраны может приводить к спонтанной тубуляции гигантских униламеллярных везикул. При этом предполагается, что амфифильные полипептиды выполняют пассивную роль «якоря», закрепляющего белок на мембране, а частичное внедрение амфипатических участков белков в мембрану не оказывает значительного влияния на его форму. В данной работе мы диспутируем о роли амфипатических мотивов периферийных белков, которую они могут играть в процессе морфогенеза клеточных мембран. На примере H0 пептида ENTH домена белка пептида нами проведено исследование взаимодействия таких пептидов с липидным бислоем различной геометрии и липидного состава, а также влияния пептидов на изменение формы и эластических параметров мембран. Методами спектроскопии КД нами показано, что в растворе пептид находится в состоянии статистического клубка. В присутствии отрицательно заряженных липидов DOPS или PIP2 пептид адсорбируется на поверхности мембраны, происходит его конформационное изменение клубок -> альфа-спираль. В случае неспецифического взаимодействия с заряженной мембраной пептид обладает большей аффинностью к мембранам с большей кривизной поверхности. На модельной системе – липидной нанотрубке (НТ), было показано, что при встраивании H0 спирали во внешний монослой НТ наблюдается почти двукратное уменьшение изгибной жесткости, в результате чего происходит сужение НТ. Была разработана теоретическая модель, объясняющая такое изменение модуля изгибной жесткости. В данной модели предполагается, что частичное встраивание в верхний монослой мембраны приводит к генерации существенной спонтанной кривизны в ней. Согласно теоретическим предсказаниям внешний монослой должен приобретать пластические свойства. В таком случае геометрия поверхности мембраны должна определяться спонтанной кривизной внутреннего монослоя. Действительно, при наличии небислойного липида DOPE в составе гигантской униламеллярной везикулы встраивание H0 пептидов в верхний монослой приводит к спонтанному вытягиванию из везикул протяженных цилиндрических нитей – тубул. В отсутствие небислойных липидов такого эффекта не наблюдалось. На основании полученных результатов можно выдвинуть предположение о существовании универсального механизма регуляции геометрической формы мембран, в основе которого лежит липид-белковый синергизм.

Литература

1. McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling // *Nature*. – 2005. – Т. 438. – №. 7068. – С. 590-596.



НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

13–14 апреля 2021

2. Bassereau P. et al. The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2018. – Т. 51. – №. 34. – С. 343001.
3. Stachowiak J.C. et al. Membrane bending by protein–protein crowding // *Nature Cell Biology*. – 2012. – Т. 14. – №. 9. – С. 944-949.



**ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ
С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ
РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ РАКА**

А.Н. Казакова, К.С. Ануфриева, О.М. Иванова, В.О. Шендер, П.В. Шнайдер,
Ж.Ж. Баймуханова, А.В. Еремеев, Н.И. Дризе, М.А. Лагарькова, Г.П. Арапиди

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Опухоль-ассоциированные фибробласты (CAF) являются ключевыми компонентами стромального микроокружения опухолевых клеток и играют важную роль в стимуляции роста, инвазии и метастазировании опухоли. Однако ограничивающим фактором изучения опухоль-ассоциированных фибробластов является проблема их выявления среди всех клеток опухоли. Существующие гены-маркеры, с помощью которых в различных исследованиях выявляют CAF, активно экспрессируются и другими мезенхимальными клетками микроокружения опухоли, в том числе нормальными активированными фибробластами (NF). Перспективность изучения CAF, в том числе для терапевтического применения, приводит к необходимости поиска более специфичных маркеров CAF. Мы проанализировали изменения транскрипции генов по данным секвенирования мРНК для 6 различных типов рака. Нами было обнаружено, что большинство существующих генов-маркеров для идентификации CAF также экспрессируются в NF местной соединительной ткани опухоли. По данным секвенирования мРНК был предложен список генов-маркеров, позволяющих отличить CAF от NF. Мы обнаружили, что найденные гены играют важную роль в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса, активации тромбоцитов, регуляции различных сигнальных путей и гликозилирования белков. Затем мы изучили экспрессию выбранных генов в наборе данных секвенирования мРНК 936 раковых клеточных линий человека. Также, чтобы рассмотреть экспрессию найденных генов в клетках опухоли и ее микроокружения, мы проанализировали 13 общедоступных наборов данных секвенирования мРНК одиночных клеток опухоли для 9 различных типов рака. Чтобы агрегировать результаты 3 описанных выше анализов, мы ввели рейтинговую систему, которая учитывает все требования к потенциальным генам-маркерам CAF. В результате интеграции данных были обнаружены гены, которые лучше всего выявляют опухоль-ассоциированные фибробласты среди всех клеток опухоли: OLFML1, ADH1B, MYH11, RSPO3, CCL11, DIO2, ABCA9, CDH6, CRXM2 и TBX2. Результаты биоинформатического анализа были верифицированы при помощи количественного анализа методом ПЦР на нормальных фибробластах и CAF.

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



ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ПРИ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА РЕФЛЮКТАТА: *IN VITRO* МОДЕЛЬ

С.В. Калиш

Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Цель исследования. Обобщенный анализ изменений функциональной активности макрофагов на основании данных о фагоцитарной активности, цитокиновом профиле, изменении уровня экспрессии поверхностных маркеров, характерных для про- или противовоспалительного фенотипа клеток при воздействии рефлюктатов различного типа[1,2].

Материалы и методы. Разработана *in vitro* модель кокультивирования перитонеальных макрофагов мышей C57/BL6 ($n=65$) и рефлюктатов пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ; $n=65$), имеющих различные значения pH (три группы сравнения). Учитывались стандартные критерии – фагоцитарная способность (поглощение *Staphylococcus aureus* 9198, световая микроскопия), секреторная активность (цитокиновый профиль Th1/Th2, проточная цитометрия) и рецепторная характеристика макрофагов (экспрессия CD25/80/163/206, проточная цитометрия).

Выводы. Показатели фагоцитарной активности макрофагов, не ассоциированы с величиной pH добавляемого рефлюктата. Защелачивание рефлюктата ведет к значимому изменению экспрессии CD-рецепторов – снижению M1 и увеличению M2. Индекс суммарной продукции Th1/Th2 в группах прогрессивно снижался с увеличением pH рефлюктата и составил 3,6 единицы в группе pH 4,6–6,6; 2,8 единицы в группе pH 6,7–7,2 и 1,6 единицы в группе pH 7,3–8,1, что обусловлено увеличением продукции Th2-цитокинов при смещении pH рефлюктата в слабощелочную сторону. Полученные данные указывают на увеличение экспрессии и секреции противовоспалительных маркеров при щелочном сдвиге pH рефлюктата. Анализ изучаемых характеристик профиля активности макрофагов в предлагаемой *in vitro* модели обосновывает необходимость учета особенностей функциональной активности макрофагов при воздействии на них рефлюктатов различного характера. Показана особая значимость изучения цитокинового профиля и особенностей функциональной активности макрофагов у больных ГЭРБ с учетом характера рефлюктата.

Литература

1. El-Serag HB, et al. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. 2014 Jun;63(6):871-80. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304269. Epub 2013 Jul 13.
2. Maev IV, et al. Gastroesophageal reflux disease – Disease of XXI century. *Attending Doctor*. 2004;(4):10-14.



КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ВЕДЕНИЮ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

И.В. Колесникова, Н.Б. Захаржевская, Д.А. Кардонский, Д.Н. Конанов, В.А. Иванов,
Р.И. Маторин, Т.Н. Калачнюк, С.В. Лямина, Ю.А. Беспярых, В.М. Говорун

Лаборатория молекулярной патофизиологии, Центр молекулярной медицины и диагностики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Молекулярные методы исследования позволяют существенно расширить возможности диагностики и ведения пациентов с многофакторными заболеваниями. В основе патогенеза болезни Крона лежит несколько механизмов, которые в ряде исследований экспериментально обоснованы и должны быть учтены при выборе стратегии лечения таких пациентов. Целью данной работы была разработка комплексного мультидисциплинарного подхода к диагностике болезни Крона.

В данной работе пациентам с подозрением на болезнь Крона были проведены рутинные лабораторные исследования, согласно стандартам оказания медицинской помощи для соответствующей нозологии. Проведен анализ генетических маркеров, ассоциированных с заболеванием. Определен профиль короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) и летучих метаболитов в кале методом ГХ-МС с использованием Хроматэк-Кристалл 2000М и Shimadzu QP2010 Ultra с парофазным экстрактором Shimadzu HS-20. Оценку спектра стволовых маркеров в образцах биопсии проводили методом иммуногистохимии с использованием антител antiTERT.

В ходе исследования высокорисковых полиморфных локусов, ассоциированных с болезнью Крона, были получены мутантные генотипы некоторых полиморфизмов, что свидетельствует о повышенном риске развития данного заболевания. При анализе соотношения КЦЖК была выявлена тенденция к резкому количественному и качественному снижению бутирата, а также изменению соотношения представленности КЦЖК в отличие от нормы. Методами статистической обработки представлен расчетный рисковый коэффициент диагностической значимости метаболомного профилирования. Полученные гистологические препараты свидетельствуют о патологических изменениях, характерных для болезни Крона.

Суммарно полученные данные свидетельствуют, что использование системного и мультидисциплинарного подхода позволяет провести верификационную и дифференциальную диагностику болезни Крона среди других воспалительных заболеваний кишечника, прогнозировать тяжесть течения и оценить потенциальные варианты терапии.



ВЫЧИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПРЕДСКАЗАНИЯ КЛАСТЕРОВ СИНТЕЗА НЕРИБОСОМАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ

Д.Н. Конанов, Д.В. Кривонос, В.В. Бабенко, Е.Н. Ильина

Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Нерибосомальные пептиды (NRP) – группа структурно-разнообразных вторичных метаболитов, синтезируемых крупными модульными ферментами NRP-синтазами (NRPs). Любой модуль NRPs обязательно включает в себя 3 домена: домен аденилирования (А-домен), домен конденсации (С-домен) и домен транспорта (РСР-домен). Эволюция NRPs привела к тому, что последовательность мономеров в конечном продукте зависит почти исключительно от А-доменов, осуществляющих захват аминокислот из окружающей среды. Однако описанные в литературе механизмы конденсации позволяют предположить субстратную специфичность и для С-доменов. Поэтому одной из целей данного исследования стала оценка субстратной специфичности С-доменов. Более приближенная к практике задача состояла в создании инструмента, позволяющего по химической структуре соединения определять генетические структуры, ответственные за его синтез, и, как следствие, выявлять его возможных продуцентов.

В качестве базы данных был использован MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster). Для каждого субстрата независимо были обучены скрытые марковские модели (НММ). Распознавание мономеров в продукте синтеза осуществлялось с помощью rBAN (retroBiosynthetic Analysis of Nonribosomal peptides), предполагаемая схема синтеза определялась как эйлеров путь по всем амидным связям в молекуле.

Модульность NRPs позволяет хранить результаты работы НММ в формате матрицы с позиционно-специфичными значениями (position-specific score matrix или PSSM), где каждая строка соответствует возможному субстрату, а каждый столбец модулю. Метрика выравнивания структуры на PSSM была определена как сумма по соответствующим позициям матрицы. Для оценки достоверности каждого конкретного выравнивания применялся перестановочный тест. Для тестирования метода был выбран Leave-One-Object подход. AUC-ROC для доменов конденсации составила 0,82, что позволяет говорить о том, что, во-первых, субстратная специфичность у С-доменов есть, во-вторых, что ее достаточно, чтобы с неплохой точностью искать кластеры синтеза соединений известной структуры. Для более специфичных А-доменов AUC-ROC составила 0,98, что говорит об очень высокой предсказательной силе модели.



ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ОТВЕТ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* НА ИНФЕКЦИЮ, ВЫЗВАННУЮ БАКТЕРИОФАГОМ СЕМЕЙСТВА *HERELLEVIDAE*

Н.С. Купцов, М.А. Корниенко, Д.А. Беспятых, Р.Б. Городничев, К.М. Климина,
Е.А. Шитиков

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов

Широкое распространение бактерий с множественной лекарственной устойчивостью признано ВОЗ глобальной угрозой для современной системы здравоохранения. Бактериофаги – одна из самых многообещающих альтернатив в борьбе с бактериальными инфекциями.

Цель исследования заключалась в оценке изменения транскрипционных сигнатур штамма *S. aureus* Sa515 в ответ на инфекцию, вызванную вирулентным вирусом семейства *Herelleviridae*.

Материалы и методы. Объектом исследования был клинический штамм *S. aureus* SA515 (spa-тип t008; ST8), чувствительный к бактериофагу vB_SauM-515A1. Бактериофаг vB_SauM-515A1 – типичный представитель рода *Kayviruses* семейства *Herelleviridae*, выделен из коммерческого препарата АО НПО «Микроген». Для проведения транскрипционного анализа бактериальную культуру инфицировали фагом (МОИ = 10) и отбирали пробы через 5, 15 и 30 мин (три биологических повтора). Секвенирование РНК выполняли на платформе Illumina. Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) были идентифицированы с использованием пакета edgeR (FDR ≤ 0,001; FC ≥ 2).

Результаты. Согласно результатам секвенирования, доля парных прочтений, картирующихся на геном хозяина, снижалась с 74% на 5 минуте до 20% на 30 минут, тогда как для бактериофага соответствующие показатели увеличились с 10% до 56%. Для Sa515 было определено 253/2767 (9,14%) уникальных ДЭГ, причем их количество уменьшилось с 170 на 5 минуте до 67 на 30 минуте. Наиболее важные процессы, претерпевшие изменения на 5 минуте, относились к путям метаболизма аминокислот (11 генов), двухкомпонентным системам регуляции (11), метаболизму азотистых оснований (8) и углерода (8). С 15 минуты наблюдалась гиперэкспрессия генов профагов.

Выводы. Ключевые изменения транскрипционного профиля клеток *S. aureus* при инфекции вирулентным бактериофагом семейства *Herelleviridae* наблюдались на начальных этапах инфекции и затрагивали основные метаболические пути.



ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА НОВЫХ АНТИСТАЗИН-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

В.Н. Лавренова, Е.Н. Графская, Д.А. Широков, П.А. Бобровский, Д.Д. Харлампиева,
В.В. Бабенко, В.А. Манувера, В.Н. Лазарев

Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Терапевтическое применение пиявок известно ещё с древних времён. Экспрессия в их слюнных железах различных белковых и пептидных ингибиторов гемостаза делает пиявок интересным объектом как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Ранее в нашей лаборатории был отсеквенирован геном и транскриптом медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*, биоинформатический анализ которых позволил выявить более десятка новых последовательностей, кодирующих потенциальные антикоагулянтные белки.

Целью работы являлось получение и изучение свойств новых антистазин-подобных белков медицинской пиявки. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: получить генно-инженерные конструкции для экспрессии белков в бактериальной и эукариотической системах экспрессии, получить очищенные препараты белков, оценить их антикоагулянтные свойства по таким показателям, как активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ).

В прокариотической системе экспрессии были получены исследуемые белки, слитые с полигистидиновой последовательностью или также с прокариотическом белком-шапероном SlyD. В эукариотической системе экспрессии были получены белки, слитые с полигистидиновой последовательностью или также с легкой цепью иммуноглобулина G. Для получения целевых белков использовали металл-аффинную хроматографию, обработку TEV-протеиназой (для белков, слитых со SlyD или лёгкой цепью иммуноглобулина G) с последующей ионообменной хроматографией. После функциональных тестов было выявлено 4 белка, которые значительно увеличивают АЧТВ по сравнению с контрольным образцом, а также 1 белок, который значительно увеличивает ТВ.

Отобранные по результатам работы белки, значительно влияющие на показатели гемостаза, являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований и разработки новых антикоагулянтных препаратов.



**АНАЛИЗ АДГЕЗИВНО-ИНВАЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ПРОТЕОМНОГО
ПРОФИЛЯ МЕМБРАННОЙ И СЕКРЕТИРУЕМОЙ ФРАКЦИЙ ИЗОЛЯТА *E. COLI*,
ПОЛУЧЕННОГО ОТ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА**

А.В. Ли, М.А. Галямина, В.Г. Ладыгина, С.И. Ковальчук, Е.В. Михальчик, О.В. Побегуц,
Г.Ю. Фисунов

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Болезнь Крона (БК) является тяжелым хроническим иммуноопосредованным гранулематозным воспалительным заболеванием желудочно-кишечного тракта, механизмы патогенеза которого остаются пока невыясненными. В связи с этим на сегодняшний день не существует специфического лечения пациентов. Метагеномный анализ образцов кала и биопсии от пациентов с БК показал, что одной из особенностей этой болезни является увеличение количества *E. coli*, способных прикрепляться к клеткам эпителия, преодолевать эпителиальный барьер, выживать и реплицироваться внутри макрофагов (адгезивно-инвазивные *E. coli*, АИЕК), а также поддерживать воспалительный процесс, индуцируя продукцию провоспалительных цитокинов. Предполагают, что АИЕК могут вносить существенный вклад в развитие БК. Нами получен изолят *E. coli* ZvL2 (БК-изолят) от больного с БК. Целью исследования явилось изучение вирулентных свойств этого изолята в сравнении с контрольными штаммами (лабораторный штамм K12 и изолят *E. coli* от здорового человека). С помощью инфекционной модели Сасо-2 и клеточной линии моноцитов ТНР-1 показано, что БК-изолят обладает адгезивно-инвазивным фенотипом и высокой способностью выживать в макрофагах в отличие от контрольных штаммов. Показано, что вирулентный фенотип БК-изолята зависит от источника углерода в среде культивирования: продолжительное пассирование в среде М9 с добавлением глюкозы значительно снижает, а с добавлением пропионата натрия (РА), наоборот, увеличивает вирулентные свойства БК-изолята. Подобного эффекта не наблюдалось для контрольных штаммов. В итоге получен изогенный штамм БК-изолята в двух состояниях – активном (аАИЕК) и неактивном (нАИЕК). Анализ продукции супероксид радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) макрофагами методом хемилюминесценции показал, что при взаимодействии с аАИЕК макрофаги продуцируют значительно более низкий уровень $\cdot\text{O}_2^-$ по сравнению с нАИЕК. Сравнительный протеомный анализ мембранной фракции и фракции секретируемых белков для этих двух состояний показал, что РА индуцирует значительные изменения представленности белков. Определены основные группы белков, которые являются значимыми для формирования и поддержания адгезивно-инвазивного фенотипа БК-изолята.



ПРОИЗВОДНЫЕ ФЕНОКСАЗИНА С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ КАК ЛИГАНДЫ К G4-СТРУКТУРАМ ДНК

С.А. Лизунова, В.Б. Цветков, Т.С. Ведехина, М.А. Лагарькова, Т.А. Николенко,
В.О. Шипунова, Д.А. Скворцов, А.В. Аралов, А.М. Варижук, Г.Е. Позмогова

Лаборатория искусственного антителогенеза ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

G-квадруплексы (G4) — класс неканонических вторичных структур нуклеиновых кислот, рассматривающийся в настоящий момент в качестве перспективных мишеней для противоопухолевой, противовирусной и антибактериальной терапий. В работе рассмотрены новые лиганды на основе феноксазина для стабилизации G4 из теломерных повторов и промоторной области онкогена cKit. Новые производные феноксазина не только проявили высокие стабилизирующие эффекты, сравнимые с эффектами хорошо известных G4-лигандов (PDS, NMM), но и оказались селективными к выбранным мишеням по сравнению с дуплексной ДНК. Исследуемые лиганды ингибировали клеточную активность с EC50, соответствующей их сродству к G4-мишеням и стабилизирующим эффектам, что подтверждает G4-опосредованные механизмы действия. Особенно токсичными лиганды оказались для клеток аденокарциномы легких A549 (EC50 в наномолярном диапазоне), чуть менее — для клеток рака молочной железы MCF7, а также иммортализованных фибробластов VA13 и эмбриональных клеток почек HEK293t (EC50 в микромолярном диапазоне). Для дальнейших работ с лигандами на животных моделях необходимо использовать дополнительные адресующие агенты и/или транспортеры для повышения избирательности норма/опухоль. Анализ внутриклеточной локализации лигандов показал преимущественное проникновение лигандов в ядро и ядрышки. При этом наблюдался дозозависимый эффект. Таким образом, новые лиганды на основе феноксазина являются перспективными терапевтическими агентами с G4-направленным воздействием.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ [20-15-00017].



ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ВО ВРЕМЯ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

Н.В. Малышев, Д.С. Матюшкина, И.О. Бутенко, В.М. Говорун

Лаборатория простых систем ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Болезни Паркинсона и Альцгеймера – наиболее распространенные формы деменции. Одним из основных событий, приводящих к нейродегенеративным процессам, является агрегация и отложение белков, которые ведут к гибели нейронов. Гипотеза о вовлеченности инфекции мозга в патогенез аномального накопления белков набирает все больше данных. Различные нейродегенеративные состояния сопровождаются частыми бактериальными инфекциями, и род *Mycoplasma* – наиболее встречающийся. Цель данной работы – оценить влияние микоплазменной инфекции на протеомные и транскрипционные изменения, происходящие в нейронах при инфицировании культуры клеток *M. gallisepticum*, а также оценить способность микоплазмы на агрегацию амилоидного предшественника

Нами было проведено исследование протеомного состава нейронов до и после микоплазменной инфекции. После 7 дней совместной с бактериями инкубации нейрональные предшественники были подвергнуты трипсинолизу, полученные пептиды были проанализированы с помощью количественного шотган анализа на масс-спектрометре Q Exactive HF. На основании данных KEGG, полученный протеомный профиль кластеризуется по путям, связанным с нейродегенеративными процессами.

Также, в нейронах, инкубированных с микоплазмой, был проведен анализ экспрессии различных киназ, вовлеченных в каскады болезней Паркинсона и Альцгеймера (ABL1, GSKA, MAPK, AMPK и др.). ПЦР анализ с обратной транскрипцией показал увеличение экспрессии каталитической субъединицы альфа цАМФ-активируемой протеин-киназы, а также некаталитической бета 2 и каталитической альфа 2 субъединицы АМФ-активируемой протеин-киназы. Эти белки участвуют в катаболических процессах, что говорит о высоких энергетических затратах клетки, а также в процессы лизосомального повреждения и фероптоз. Данные формы клеточной смерти являются основными при нейродегенеративных состояниях.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-15-00427 «Выяснение роли внутриклеточных патогенов в развитии нейродегенерации».



СКРИНИНГ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА: МИРОВОЙ ОПЫТ И НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ

Р.И. Маторин, В.А. Мочалов, А.А. Архипов

Эндоскопическое отделение ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Согласно данным GLOBOCAN за 2018 год, в мире выявлено 1,8 миллионов новых случаев и 881000 смертей от колоректального рака (КРР). Таким образом, КРР является третьим по смертности и четвертым по частоте выявления раком в мире (1).

В России отмечается относительно высокий уровень заболеваемости и смертности от колоректального рака (более 77 тыс. новых случаев и чуть менее 40 тыс. смертей на 2019 год). В структуре онкологической заболеваемости в России рак толстой кишки занимает третье место и составляет 12,1% (2). При изучении динамики за 10 лет очевиден неуклонный рост заболеваемости КРР в России приблизительно на 3% в год.

Нельзя не отметить, что заболеваемость и смертность от КРР значительно различается в разных регионах мира. Оценивая тренды заболеваемости и смертности от КРР в разных странах мира, Арнольд и др (3) указали на наличие 3 различных глобальных паттернов:

- 1) увеличение как заболеваемости, так и смертности в последнее десятилетие (Россия, страны Балтии, Китай и Бразилия и др.);
- 2) рост заболеваемости, но снижение смертности (Канада, Великобритания, Дания);
- 3) снижение заболеваемости и снижение смертности (США, Япония, Израиль и Франция).

Рост заболеваемости, по всей видимости, связан с изменением образа жизни, характера питания, ожирением и другими факторами, в то время как снижение смертности, наблюдаемое в более развитых странах, обусловлено развитой и доступной медициной.

Особого внимания заслуживает равномерное снижение заболеваемости и смертности от КРР в Японии, Израиле и США. Эти страны в числе первых, еще с 1990-х годов организовали у себя скрининговые программы, которые успешно работают по сей день. Данный факт позволяет предположить, что скрининг КРР, помимо прочего, является значимым фактором снижения заболеваемости и смертности от КРР в долгосрочной перспективе.

Литература

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
2. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова, злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность), Москва 2020
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality // *Gut* 2017;66:683-691.



АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПЕПТИДОГЛИКАН-РАСПОЗНАЮЩИХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 SAM

В.Д. Мороз, П.А. Бобровский, В.Н. Лавренова, В.Н. Лазарев

Лаборатория генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Бактериальные инфекции являются одной из серьёзнейших проблем человечества из-за развития устойчивости к антибиотикам. Одним из подходов борьбы с инфекционными заболеваниями является разработка способов использования белков врожденного иммунитета. Примером таких агентов могут служить пептидогликан-распознающие белки человека (PGLYRP), которые обладают высокой бактерицидной активностью как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Ранее в нашей лаборатории было показано действие рекомбинантных PGLYRP на *Chlamydia trachomatis* – грамотрицательную бактерию, возбудителя урогенитальных заболеваний, поэтому целью данной работы было попытаться повысить экспрессию собственных генов пептидогликан-распознающих белков в клетках линии HeLa, искусственно активируя их иммунный ответ на *Chlamydia trachomatis* и таким образом избегая различных трудностей, связанных с доставкой рекомбинантных белков в клетки. В данной работе мы активировали экспрессию генов с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 SAM. В ходе работы мы валидировали промоторные области генов *pglyrp*, подобрали протоспейсерные последовательности для получения гидовых РНК. Мы получили лентивирусные частицы, содержащие в своем геноме компоненты системы CRISPR/Cas9 SAM. Мы трансдуцировали клетки линии HeLa лентивирусными частицами и получили клеточные линии, кодирующие дефектную нуклеазу Cas9, комплекс MS2-p65-HSF для активации экспрессии генов и гидовые РНК, распознающие промоторные области генов *pglyrp*. В результате мы получили клеточные линии с увеличенной экспрессией генов пептидогликан-распознающих белков человека в 8-55 раз. Клетки с усиленной экспрессией генов пептидогликан-распознающих белков продемонстрировали ингибирование хламидийной инфекции. Таким образом, мы показали, что активация экспрессии собственных генов врожденного иммунитета человека, а именно генов пептидогликан-распознающих белков, приводит к эффективному противодействию заражению бактерией *Chlamydia trachomatis*.



**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОММЕНСАЛЬНОГО
БАКТЕРИАЛЬНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* MG1655
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НЕГО ЗАЩИТНЫХ ФАКТОРОВ ИММУННОГО
ОТВЕТА ХОЗЯИНА**

В.А. Мусарова, Д.С. Матюшкина, И.О. Бутенко, Я.К. Семин, М.Н. Синягина, Т.В. Григорьева,
В.М. Говорун

Лаборатория простых систем ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Слизистый слой состоит из сложной сети муцина и противомикробных белков, пептидов, которые покрывают эпителиальные поверхности желудочно-кишечного тракта, препятствуя тем самым проникновению микроорганизмов в эпителиальные клетки. Формирование биопленок в естественных условиях является стандартным способом роста бактерий в кишечнике, регулируемым как микробиотой, так и хозяином, обеспечивая толерантность по отношению к собственной микрофлоре. Как полагают, именно секреторные IgA (sIgA), которые секретируются в просвет кишечника, являются главным фактором, поддерживающим такие толерантные взаимоотношения, однако их механизм до сих пор не изучен. Известно, что для успешного образования биопленки необходимы и секреторные антитела, и муцин. Поскольку до сих пор точно неизвестно, за счет чего складывается толерантность к кишечной микрофлоре, и как sIgA, а также муцин влияют напрямую на физиологию бактерий при их связывании, тема исследования иммунной системы хозяина и бактерии в просвете кишечника является актуальной. В связи с этим, целью данного исследования являлось определение влияния мышинных естественных IgA антител и муцина на физиологию одного из представителей кишечного микробиома эукариот – *Escherichia coli* с помощью протеомного анализа.

В связи с этим были отобраны с помощью проточной цитометрии и вестерн-блоттинга естественные моноклональные мышинные IgA, которые наиболее специфично связывали *E. coli* MG1655. Кишечная палочка подвергалась инкубации как с присутствием антител и муцина, так и в отсутствии таковых, идентификация физиологических изменений, которые претерпевает *E. coli* под воздействием данных индукторов, была проведена с помощью масс-спектрометрического анализа. С помощью протеомного анализа нами был идентифицирован пул бактериальных белков, представленность которых изменялась только в опытных группах. Таким образом, нами выделены пулы бактериальных белков, которые меняются при совместной инкубации кишечной палочки с иммуноглобулинами класса А и/или с муцином.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-00-00293.



ВЛИЯНИЕ ГЕНОМНЫХ G4 НА ОБРАЗОВАНИЕ ХРОМАТИНОВЫХ ПЕТЕЛЬ И ТАД

Ю.И. Павлова, А.Н. Богомазова, П.О. Тихонова, В.Б. Цветков, Т.С. Ведехина, К.М. Климина, Е.А. Исаакова, М.А. Лагарькова, Г.Е. Позмогова, А.М. Варижук

Лаборатория искусственного антителогенеза ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

В данной работе мы исследуем взаимодействие геномных G-квадруплексов (G4) с белковыми факторами, влияющими на укладку хроматина. Глобальной целью данной работы является поиск подходов к управлению 3D-структурой хроматина за счет действия на G4 низкомолекулярными лигандами для регуляции генной экспрессии. Это направление можно отнести к эпигенетической терапии. Предпосылками к данной работе было выполненное нашей группой ранее профилирование на микрочипах, которое показало сродство факторов укладки хроматина, в том числе HMG-белков (англ., high –mobility group) и ASXL1 (англ., additional sex combs-like 1), к G4. Кроме этих белков мы рассматривали CTCF (CCCT-связывающий фактор), определяющий границы топологически ассоциированных доменов (ТАД). Используя опубликованные данные ChIP-seq для белков HMGN1, HMGN3, ASXL1 и CTCF, мы доказали, что эти белки статистически достоверно колокализуются с G4, и отобрали мотивы для экспериментальной проверки *in vitro*. Методом микромасштабного термофореза мы показали аффинность G4 к CTCF, HMGN1, HMGN3 и HMGB2. Связывание G4 с CTCF дополнительно охарактеризовали методом молекулярного моделирования. Затем, используя антитела к CTCF, мы выполнили иммунопреципитацию хроматина опухолевых клеток K562, обработанных G4-стабилизирующим лигандом, чтобы оценить влияние лиганда на локализацию CTCF. Далее с помощью количественной ПЦР мы установили, что за первые 24 часа обработки лигандом в низкой концентрации не происходило заметных количественных изменений. При 48-часовой обработке G4-стабилизирующим лигандом количество CTCF на G4-сайтах возросло в 2-3 раза по сравнению с клетками, не подвергшимися обработке. Таким образом, мы показали, что G4 участвуют в организации укладки хроматина за счет связывания с белковыми факторами HMGN1, HMGN3, ASXL1, CTCF, и лиганды к G4 могут использоваться в качестве эпигенетических терапевтических агентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ [19-15-00128].



ОПАСНЫ ЛИ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА SARS-COV-2?

Л.Н. Пенкин, Д.С. Матюшкина, В.А. Мусарова, Д.Д. Харламбиева, В.А. Манувера,
Г.П. Арапиди, А.И. Манолов, А.В. Павленко, В.Н. Лазарев, В.М. Говорун

Лаборатория простых систем ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Новый коронавирус SARS-CoV-2 и вызванное им заболевание COVID-19 быстро распространились с момента упоминания о первом случае инфицирования в Ухане (Китай) и стало серьезной угрозой мирового значения. Кроме того, появляются сообщения о новых более опасных штаммах SARS-CoV-2 – «Британском» и «Американском». Для понимания того, с какой вирусной угрозой столкнулось человечество, насколько она опасна и каковы последствия данной инфекции, важным и необходимым является проведение масштабного исследования коронавирусной инфекции, приведшей к развитию COVID-19.

Существует ряд заболеваний, такие как, например, инфекция, вызванная вирусом Денге, при которых наличие связывающих, но не нейтрализующих антител, были ассоциированы с ухудшением клинической картины и исходом заболевания в связи с развитием антителозависимого усиления инфекции (ADE), что позволяет предположить, что при определенных обстоятельствах антитела могут коррелировать с тяжестью клинической картины у пациентов. Нами было выдвинуто предположение, что некоторые симптомы COVID-19 могут быть вызваны неспецифическим связыванием IgG антител против SARS-CoV-2 с собственными белками человека. Для проверки этой гипотезы был проведен биоинформатический анализ гомологии между белками вируса Sars-Cov-2 и человека. Было идентифицировано 22 пресекающихся по пяти аминокислотам белка. Из них было отобрано 8 белков, последовательности которых могут быть презентированы МНС I класса. Для них были подобраны праймеры для последующего транскриптомного анализа 3 клеточных линии человека (A549, T84, Raji) при их инкубации с сыворотками пациентов с COVID-19. Кроме того, было проанализировано их связывание с белками человека с помощью вестерн-блот анализа. Проведена корреляция между наблюдаемым связыванием с IgG ответом на вирусные белки методами ИФА и вестер-блоттинга.

По итогам экспериментов были выявлены существенные различия в экспрессии генов между контрольной группой и клетками, инкубированными с сыворотками больных. Полученные результаты проливают свет на новые механизмы патогенеза коронавирусной инфекции, вызванной вирусом Sars-Cov-2.



ГЕНОМНЫЕ I-МОТИВЫ В РОЛИ СЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ pH В КЛЕТКАХ

А.В. Тураев, Н.А. Петрунина, В.В. Лебедев, А.В. Аралов, М.А. Лагарькова, Г.Е. Позмогова,
А.М. Варижук

Лаборатория искусственного антителогенеза ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Геномные i-мотивы (iM) могут выступать в роли биосенсоров при физиологических условиях, поскольку они обладают высокой чувствительностью к малым изменениям pH. В работе рассматривались биосенсоры, состоящие из олигодеоксирибонуклеотидных (ОДН) последовательностей iM, меченных флуорофором с одного конца и гасителем с другого. Было показано, что скорость отклика iM на изменение pH коррелирует со скоростью отклика на изменение температуры. Оценивали это по данным термического гистерезиса, т.е. по соотношению кривых плавления и отжига. Данный простой общедоступный метод позволил провести предварительный отбор перспективных (быстрых) сенсоров. Кинетика отклика отобранных сенсоров на малые изменения pH в диапазоне 6,7–7,3 была дополнительно исследована методом остановленного потока и описывалась биэкспоненциальной функцией, что указывает на двухэтапный процесс образования конформеров: формируется кинетически предпочтительный («быстрый») и термодинамически предпочтительный («стабильный») конформер, с последующей постепенной перегруппировкой «быстрого» в «стабильный». По результатам *in vitro*-экспериментов, в том числе на клетках методом флуоресцентной микроскопии, из серии сенсоров-кандидатов с различными метками был отобран лидер – FAM-ATX-BHQ (iM на основе ОДН последовательности из гена ATXN2L). Рассмотренные сенсоры предположительно нечувствительны к кальцию при условии, что общая ионная сила примерно постоянна, и имеют тенденцию концентрироваться в ядрах клеток. Одним из ограничений использования сенсоров на основе iM является их чувствительность к изменениям температуры, ионной силы и возможная деградация сенсора нуклеазами. Через 3–4 дня после трансфекции применимость сенсоров ставится под сомнение, так как происходит перераспределение флуорофоров в клетках. Первое поколение предложенных нашей группой сенсоров не предусматривает защиты от нуклеаз [1]; сенсоры второго поколения несут модификации в петлях, препятствующие деградации iM, а также улучшающие кинетические характеристики (скорость отклика сенсора на изменение pH).

Литература

1. A.V. Turaev, et al, "Genomic DNA i-motifs as fast sensors responsive to near-physiological pH microchanges" // *Biosensors and Bioelectronics*, 175 (2021) 112864



ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ИНАКТИВАЦИЕЙ ГЕНА *БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА*

Е.К. Секретова, М.Е. Богомякова, П.А. Бобровский, А.В. Еремеев, М.А. Лагарькова

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) обладают способностями к неограниченной пролиферации и дифференцировке во все типы взрослых соматических клеток. Благодаря этим свойствам ИПСК рассматриваются как потенциальный ресурс для клеточной терапии. Дифференцированные производные клеточных линий ИПСК с пониженной иммуногенностью теоретически будут подходить для трансплантации любому реципиенту, не вызывая иммунного отторжения. Один из возможных подходов к гипоиммуногенным линиям ИПСК – это делеция гена *бета-2-микροглобулина* (*b2m*), продукт которого представляет собой константную цепь молекулы HLA I класса. Отсутствие молекул HLA-I будет снижать иммуногенность клеток по отношению к CD8⁺ Т-лимфоцитам, однако это может стать причиной повышенного NK-клеточного лизиса. В нашей лаборатории ранее были получены линии ИПСК с нокаутом гена *b2m*: Huv0SΔb2mcl6 и IPSRG4SΔb2mcl55/1. В ходе работы мы показали, что фибробластоподобные производные (ФП), дифференцированные из ИПСК с нокаутом гена *b2m*, вызывают значительно более низкую активацию аллогенных CD8⁺ Т-клеток по сравнению с изогенными ФП ИПСК дикого типа. Также мы показали, что ФП Huv0SΔb2mcl6 вызывают повышенную NK-клеточную дегрануляцию, по сравнению с контролем дикого типа. Основной целью нашей работы стало получение новых линий ИПСК с биаллельным нокаутом гена *b2m*: IPSFF1S, IPSFD4S и Huv0S3 методом геномного редактирования CRISPR/Cas9. В результате, из 150 проанализированных клонов мы отобрали 2 клон Huv0S3Δb2m, 3 клон IPSFF1SΔb2m и 2 клон IPSFD4SΔb2m с гомозиготной мутацией в гене *b2m* для дальнейшей работы. Полученные линии были охарактеризованы, согласно стандартным критериям плюрипотентности.

Работа поддержана грантами РФФИ #19-29-04113-мк и #20-315-90041.



ГЕНЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРОБИОТЫ МЕДИЦИНСКОЙ ПЯВКИ *HIRUDO MEDICINALIS*

М.Ю. Серебренникова, Е.Н. Графская, В.В. Бабенко, В.Н. Лазарев

Лаборатория геномной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

С давних времен медицинские пиявки используются для лечения различных заболеваний. Тем не менее, их применение может привести к развитию инфекций, вызванных бактериями микробиоты. Микробное сообщество медицинской пиявки участвует в регуляции жизненно важных функций червя [1]. Данная работа посвящена исследованию метагенома медицинской пиявки *H. medicinalis* с целью идентификации факторов антибиотикоустойчивости.

На начальном этапе анализа был аннотирован метагеном *H. medicinalis* [2]. Были определены шесть основных групп бактерий-симбионтов: *Agrobacterium*, *Aminobacter*, *Bradyrhizobiaceae*, *Chitinophagia*, *Мухосoccales* и *Sphingobacteriia*. Далее на основе литературных данных была создана собственная база данных генов антибиотикорезистентности. В базу вошло 6616 генов, обеспечивающих устойчивость к 37 группам антибиотиков, таким как, бета-лактамы, макролиды, аминогликозиды, хинолоны. Затем метагеном был аннотирован с помощью веб-сервиса Prokka [3]. По результатам blast-анализа метагенома были определены 5 генов резистентности для *Agrobacterium* и еще 5 – для *Aminobacter*. А именно, по одному гену устойчивости к цефалоспорином, хинолонам, макролидам, тетрациклинам и стрептограминам, по 3 – к фениколам и по 2 – к аминогликозидам. Девять из них соответствовали генам, обнаруженным ранее у *Agrobacterium tumefaciens* и *Aminobacter aminovorans*. Для гена антибиотикоустойчивости к стрептограмину ближайший гомолог был обнаружен у бактерии вида *Mesorhizobium*. Результаты данного исследования дают представление об устойчивости микробиоты дикой пиявки к антибиотикам, а также позволяют в дальнейшем определить роль, которую играют отдельные виды бактерий.

Литература

1. Hildebrandt J. P., Lemke S. Small bite, large impact—saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* // *Naturwissenschaften*. – 2011. – Т. 98. – №. 12. – С. 995-1008.
2. Babenko V. V. et al. Draft genome sequences of *Hirudo medicinalis* and salivary transcriptome of three closely related medicinal leeches. // *BMC Genomics*. (2020). V.21(1):331.
3. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // *Bioinformatics*. – 2014. – Т. 30. – №. 14. – С. 2068-2069.



ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА БАКТЕРИЙ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА

Е.А. Сорокина, Ю.В. Кислун, Е.А. Денисова, Е.С. Жгун

Лаборатория геномных исследований и вычислительной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

К настоящему моменту эффективность трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ) в лечении различных патологий ЖКТ не вызывает сомнений. Препараты фекалий доставляют как через нижние отделы ЖКТ (клизма, колоноскопия), так и верхние (эндоскопия, капсулы). Общим недостатком инструментальных методов введения является их высокая инвазивность, связанная с риском перфорации кишечника и применением анестезии. Пероральные капсулы минимально инвазивны, удобны и более эстетичны, поэтому пациенты отдают предпочтение этому способу доставки препарата.

Основной вопрос, связанный с использованием замороженного кала (в том числе лиофилизата, используемого в капсулах), это его эффективность по сравнению с исходным материалом. В процессе лиофилизации клетки подвергаются действию стрессовых факторов, таких как низкие температуры, кристаллизация воды, осмотический стресс, изменения pH растворов, дегидратация. Чтобы снизить вероятность клеточных повреждений при лиофилизации используют защитные среды.

Целью работы явилась оптимизация условий лиофилизации биоматериала для фекальной трансплантации, оценка «выживаемости» микроорганизмов и сопоставление молярных соотношений короткоцепочечных жирных кислот в полученных лиофилизатах по сравнению с исходными образцами кала.

В качестве лиопротекторов в работе использовали сахарозу, желатин и их комбинации. Для оценки количества микроорганизмов проводили бактериологическое исследование. Оценивали количество бифидобактерий, лактобактерий, и общее число эшерихий и энтеробактерий. Установлено, что в лиофилизированном образце кала, содержащем в качестве защитной среды 10 % сахарозы, наблюдается наибольшее количество жизнеспособных клеток. Также, физические свойства лиофилизата (его сыпучесть) удобны для наполнения капсул.

Методом газовой хроматографии исследованы молярные соотношения КЖК в исходных образцах кала и лиофилизатах. Молярные соотношения мажорных КЖК (ацетата, пропионата и бутирата) оказались идентичны в исследуемых образцах.

Предложен состав защитной среды, в которой лиофилизированный биоматериал максимально соответствует исходному калу по количеству «живых» микроорганизмов. Лيوфилизат по своим физическим характеристикам удобен для приготовления капсул.



ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ИПСК ЧЕЛОВЕКА С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ *GNAO1* ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Д.М. Спирын, Е.А. Воловиков, К.С. Майорова, И.С. Поваров, М.А. Лагарькова

Лаборатория клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Ранняя эпилептическая энцефалопатия (РЭЭ) XVII типа – наследственная злокачественная эпилепсия, вызванная различными мутациями гена *GNAO1*, кодирующего α -субъединицу гетеротримерного комплекса G-белков с неизвестной функцией [1]. Существующие животные модели этого заболевания демонстрируют сходный фенотип, однако не полностью воспроизводят молекулярную патологию [2]. Таким образом, целью нашей работы стала разработка клеточной модели РЭЭ XVII типа.

После подписания информированного согласия у пациента с мутацией с.607G>A в гене *GNAO1* был взят биоптат кожи, откуда выделили культуру фибробластов, которую затем репрограммировали до плюрипотентного состояния вирусными векторами Сендай, несущими гены *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Затем подтвердили плюрипотентное состояние трех полученных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК).

Направленной дифференцировкой из ИПСК получили культуры нейрональных предшественников; из части клеток получили органоиды мозга и культивировали на чашках со сверхнизкой адгезией. Пэтч-кламп эксперименты на базе Научного центра неврологии показали, что полученные в среде для созревания нейроны проявляют электрофизиологическую активность. Иммуноцитохимическое окрашивание полученных культур показало экспрессию β 3-тубулина, а также присутствие белка *GNAO1* в цитоплазме всех полученных нейрональных и глиальных клеток независимо от их типа.

Известно 2 транскрипционных варианта гена *GNAO1* [3], различающихся по белок-кодирующей части, их функциональная значимость неизвестна. Экспрессию обеих изоформ в ИПСК, нейрональных предшественниках и органоидах мозга доказали методом ОТ-ПЦР. Последующие исследования локализации белка *GNAO1* впервые показали его высокую концентрацию в карิโอплазме ИПСК по сравнению с цитоплазмой.

Литература

1. Feng H. et al. A mechanistic review on *GNAO1*-associated movement disorder // *Neurobiol Dis.* 2018. 116:131-141
2. Feng H. et al. Mouse models of *GNAO1*-associated movement disorder: Allele- and sex-specific differences in phenotypes // *PLOS ONE.* 2019. 14(1):e0211066
3. Murtagh J.J. Jr et al. Different forms of *Go* α mRNA arise by alternative splicing of transcripts from a single gene on human chromosome 16 // *Mol Cell Biol.* 1991. 11(2):1146-1155



ДИАБЕТИЧЕСКАЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКАЯ ПОЛИНЕЙРОПАТИЯ: ДИНАМИКА ВЫРАЖЕННОСТИ СУБЪЕКТИВНЫХ СИМПТОМОВ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ

Н.В. Галкина, Л.Д. Спирина

Центр диабетической стопы ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Диабетическая нейропатия (ДН) является одним из самых частых осложнений сахарного диабета (СД). Распространенность среди больных СД составляет 50–70%, на момент постановки диагноза выявляется у 25%. Хроническая гипергликемия является основной причиной развития повреждения нервного волокна. ДН приводит к нарушению чувствительности стоп и развитию диабетических язв. Болевая форма ДН вызывает депрессию и тревогу и снижает приверженность к лечению. Целью настоящей работы явилась оценка динамики выраженности субъективных симптомов ДН на фоне проведенного комплексного 2-х недельного лечения в стационаре. Задачи исследования: провести субъективную оценку выраженности симптомов ДН; провести объективную оценку наличия ДН; оценить эффективность комплексного лечения болевой формы ДН. Материалы и методы: в исследование были включены пациенты, проходившие лечение в ЦДС за период с сентября 2020 г по февраль 2021г. включительно. Характеристика пациентов за период 6 месяцев было обследовано 104 человека: 47 мужчин и 57 женщин, средний возраст составил 61 год (19-85), СД 1 тип – 5 % (n=5); СД 2 тип -95% (n=99), целевой уровень HbA1c имели 10% (n=10); выше целевого уровня – 90% (n=94). Результаты исследования. Субъективная оценка боли с использованием ВАШ показало, что при поступлении сильную нейропатическую боль имели 60% больных (n= 62), умеренную – 24 % (n=25), очень сильную боль – 12 % (n=13), максимальную и минимальную боль по 2% соответственно (n=2; n=2). Субъективная оценка боли с использованием NSS Шкалы выявила тяжелую ДН у 55% (n= 57), выраженную ДН – у 25 % (n=26); умеренную ДН у 20 % (n= 21). Объективная оценка периферической вибрационной чувствительности (с помощью градуированного камертона 128 Гц) выявила ее сниженная – у 70% (n=71), отсутствие чувствительности стоп у 19 % (n= 75) и нормальную у 11 % (n=12); оценка тактильной чувствительности при помощи монофиламента выявила нормальную чувствительность у 48% (n= 49), сниженную – у 42% (n=42) и ее отсутствие у 10 % (n= 39). При окончании лечения средний уровень гликемии снизился с 12 [+/-4.3] ммоль/л до 8 [+/-2.4] ммоль/л натощак, с 18 [+/- 6.4] до 12 [+/- 4.2] ммоль/л постпрандиально. Уменьшилась выраженности боли по ВАШ статистически значимо в группах пациентов, имеющих сильную и умеренную нейропатическую боль. Исследование показало, что правильная оценка как субъективных, так и объективных симптомов ДН, комплексный подход к лечению оказывается эффективным уже в стационаре.



СРАВНЕНИЕ МЕТОДИК ИЗМЕРЕНИЯ ЛЕГКОЛЕТУЧИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОБРАЗЦАХ СТУЛА

А.Н. Трошенкова, Д.Н. Конанов, Д.А. Кардонский, Е.С. Жгун, А.С. Урбан, Н.Б. Захаржевская
Лаборатория молекулярной патофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

На сегодняшний день в литературе представлены данные по профилированию легколетучих соединений при воспалительных заболеваниях кишечника с использованием газохроматографического анализа с твердофазной экстракцией, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором или ЯМР [1]. Однако из-за отличий в способе пробоподготовки и подаче образцов в детектор полученные результаты имеют отличия. Так при использовании методов ГХ-ПИД и ЯМР образцы подаются в жидком состоянии, а в методе ГХ-МС с парофазной экстракцией аналиты переходят в начале из твердого образца, в жидкость, а после в равновесный пар, из которого и производится отбор проб. Разные физико-химические свойства аналитов приводят к тому, что на прямую сравнивать результаты трех методов некорректно. Основной задачей данного исследования являлось вычисление коэффициентов, которые позволят соотнести результаты, полученные методами ГХ-ПИД, ЯМР и ГХ-МС с парофазной экстракцией.

В работе были использованы наведенные растворы аналитов, с разной концентрацией, которые были проанализированы 3 методами. Методами статистической обработки с использованием уравнения Ван Лаара на многокомпонентные системы был посчитаны коэффициенты для пересчета полученных результатов методом ГХ-МС с парофазной экстракцией, которые возможно сравнивать с результатами, полученными двумя другими методами.

По уравнению Ван Лаара для многокомпонентных систем:

$$\ln(\gamma_k) = \frac{b_k}{\sum_{i=1}^c x_i b_i} \left(\sum_{i \neq k}^c x_i b_i \varepsilon_{ik} - \frac{G}{RT} \right)$$

Полученные результаты показали, что средняя ошибка оценки метаболического состава методами ГХ-ПИД и ГХ-МС с парофазной экстракцией практически не отличаются. Это свидетельствует о возможности сравнения получаемых различными методами анализа результатов, посредством перерасчета исходных данных.

Список литературы

- 1) S. el Manouni el Hassani *et al.*, "Optimized sample preparation for fecal volatile organic compound analysis by gas chromatography–mass spectrometry," *Metabolomics*, vol. 16, no. 10, p. 112, Oct. 2020, doi: 10.1007/s11306-020-01735-6.



НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ SARS-COV-2-ИНФЕКЦИИ: ОБЗОР ДАННЫХ ЛИТЕРАТУРЫ И ПЕРСОНАЛЬНЫЙ ОПЫТ

В.Е. Хомутов

Неврологическое отделение ФНКЦ ФХМ ФМБА

Как известно, новая коронавирусная инфекция (COVID-19) продолжает поражать человеческую популяцию по всему миру. С начала пандемии начали проводиться различные исследования, направленные на выяснение характера поражения нервной системы человека COVID-19-инфекцией. При этом было выявлено, что вирус-возбудитель заболевания обладает высокой нейротропностью, способностью оказывать непосредственное воздействие на центральную нервную систему (ЦНС), а также обуславливать развитие различных по своему характеру и тяжести осложнений после «выхода» из острого периода заболевания. В 2020 году журнал Elsevier опубликовал обзор исследований, посвященных воздействию коронавирусной (CoV) инфекции на человеческий организм с неврологической манифестацией. В обзор было включено 225 исследований, при этом, из их числа 208 исследований были связаны с заболеванием COVID-19. Наиболее часто развивающимися осложнениями явились anosmia (потеря обоняния), agnosia (потеря вкусовых ощущений), а также головная боль. При этом было отмечено, что в ряде случаев заболевание было ассоциировано с развитием более серьезных осложнений, таких как инсульт, нарушение сознания, судорожные приступы, развитие энцефалопатии. Кроме того, в некоторых статьях было указано на развитие при заболевании COVID-19 пареза глазодвигательных мышц, тригеминальной нейропатии, пареза лицевой мускулатуры, глоссофарингеальной невралгии, а также симптоматики, наблюдающейся при манифестации и развитии синдрома Гийена-Барре («классического» течения и различных его вариантов). Также летом 2020 года в журнале Lancet была опубликована статья, посвященная обзору нейропсихиатрических осложнений COVID-19 у 153 пациентов: у 125 пациентов (82%) наблюдались различные осложнения, такие как цереброваскулярные инциденты (57 пациентов получили ишемический инсульт, 9 – геморрагический, у одного пациента имело место развитие церебрального васкулита (случай был верифицирован), у 10 пациентов развились прочие сосудистые нарушения в структуре вещества головного мозга (у 2 пациентов развился тромбоз венозного синуса, у 2 – ТИА, у одного – САК, у оставшихся 5 пациентов – сосудистые изменения не были достоверно верифицированы); нарушения сознания (среди 39 пациентов у 7 патологическое состояние было ассоциировано с развитием энцефалита, у 9 – с развитием неспецифической энцефалопатии, у 23 – с нейропсихиатрической патологией); периферическая нейропатия (6 пациентов: синдром Гийена-Барре и его варианты у 4 из них, и 2 пациента с прочим типом периферического поражения); иные неврологические расстройства (миоклонус, невропатия VI ЧМН, судорожные приступы).

Таким образом, мы видим, что проявления новой коронавирусной инфекции затрагивают не только соматическую сферу (дыхательную систему, сердечно-сосудистую систему, гастроэнтерологический и прочие аспекты), но и серьезным образом влияют на нервную систему человека, неся угрозу жизни и значительно ухудшая ее качество в случае развития. Несомненно, что для верификации и разработки стратегии дальнейшего ведения пациентов требуется время на проведение новых исследований, но уже полученные сведения указывают на целесообразность данной инициативы. В сообщении представлены обзор данных литературы и



НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

13–14 апреля 2021

персональный опыт докладчика, столкнувшегося с неврологическими аспектами COVID-19-инфекции.

Ссылки на источники

- 1) <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S2215-0366%2820%2930287-X>
- 2) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7413162/pdf/main.pdf>



РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА *Mycoplasma gallisepticum* В ОТВЕТ НА СТРЕСС, ВЫЗЫВАЕМЫЙ ПРОТОННЫМ ИОНОФОРМ

Е.А. Цой, Д.В. Евсютина, Т.А. Семашко, Г.Ю. Фисунов

Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Представители класса Mollicutes, в том числе и *Mycoplasma gallisepticum*, обладают рядом особенностей. Они имеют редуцированный геном, небольшой репертуар регуляторов экспрессии генов и упрощенный метаболизм. Ранее нами было предсказано присутствие значительного количества регуляторов экспрессии генов домашнего хозяйства, в том числе генов рибосомных белков. Это входит в явное противоречие с небольшим количеством аннотированных в геноме генов регуляторов и эволюционным трендом на редукцию генома.

В данной работе мы показали, что в промоторных областях генов домашнего хозяйства присутствуют консервативные мотивы, схожие с сайтами связывания транскрипционных факторов. Мы провели исследования влияния этих последовательностей в репортерной системе с GFP и показали, что их наличие существенным образом влияет на активность промотора. Далее мы использовали модель стресса, вызываемого протонным ионофором карбонил цианид м-хлорфенил гидразоном. Этот тип стресса приводит к пертурбациям множественных процессов в клетке, в том числе росту концентрации АТФ и снижению стабильности белков. Мы показали, что гены домашнего хозяйства, для которых было показано наличие регуляторов, дифференциально экспрессируются в данном типе стресса. Таким образом, мы предполагаем, что данные регуляторы необходимы для взаимной синхронизации экспрессии генов домашнего хозяйства и поддержания определённой стехиометрии соответствующих белков.



ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДИСТРОФИЕЙ РОГОВИЦЫ ФУКСА

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

Лаборатория молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса (ДФ) — это заболевание глаз, связанное со снижением плотности и функций клеток эндотелия роговицы. Благодаря ранним исследованиям¹⁻⁴ известно, что единственным подтвержденным генетическим маркером ДФ является экспансия повторов CTG18.1 в гене TCF4, наблюдающаяся в 65% случаев заболевания. Наша цель заключалась в поиске и изучении новых локусов, ассоциированных с ДФ. В рамках данного исследования было реализовано два крупных биоинформатических подхода: полногеномное исследование ассоциаций (GWAS) и анализ вариаций числа копий в ДНК (CNV).

Первичный GWAS подтвердил сильный сигнал в области упомянутого ранее гена TCF4. Для усиления значимости других локусов с целью их последующей детекции нами была предпринята попытка провести отдельное сравнение на множестве пациентов, развитие ДФ у которых не было связано с экспансией повторов CTG18.1 (подгруппа безмаркерных пациентов). Для этого мы определили минорный гаплотип, потенциально ассоциированный с повышенным количеством повторов. Затем исключили из рассмотрения людей, обладающих данным гаплотипом, таким образом повышая значимости тех вариантов, аллели которых были перепредставлены в подгруппе безмаркерных пациентов. В результате анализа ассоциаций было выявлено 5 кандидатных локусов ($p\text{-value} \leq 5 \times 10^{-7}$), которые мы впоследствии собираемся проверить на нашей выборке, содержащей 200 больных ДФ.

Вторая часть исследования была посвящена изучению CNV, вычисленных по имеющимся чиповым данным. Мы отобрали 17 участков, статистически обогащенных в выборке пациентов с ДФ. Двое из них представляют особый интерес: это делеция вблизи старта гена ITGA11 и амплификация экзона с фрагментами интронов в гене COL26A1. Стоит заметить, что и COL26A1, и ITGA11 экспрессированы в эндотелии, причем ITGA11 экспрессирован только в образцах пациентов с ДФ без экспансии повторов CTG18.1. COL26A1 – белок внеклеточного матрикса, изменения в состоянии которого являются одним из ведущих механизмов патогенеза при ДФ. ITGA11 обеспечивает прикрепление миофибробластов к внеклеточному матриксу и также играет существенную роль в развитии фиброза. В область CNV в районе гена ITGA11 попадают сайты связывания нескольких транскрипционных факторов, часть из которых на высоком уровне экспрессируется в эндотелии. То есть, обнаруженная делеция может нарушать регуляцию, реализуемую данным сайтом связывания в эндотелии.

Литература

1. Wieben E.D., Aleff R.A., Tosakulwong N., Butz M.L., Highsmith W.E., Edwards A.O., Baratz K.H. A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy. *PLoS One*. 2012; 7(11):e49083.
2. Baratz K.H., [et al.]. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med*. 2010; 363(11):1016-1024.
3. Afshari N.A., [et al.]. Genome-wide association study identifies three novel loci in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Nature Communications*. 2017; 8:14898.



НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ФГБУ ФНКЦ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФМБА России

13–14 апреля 2021

4. Skorodumova L.O., Belodedova A.V., Antonova O.P., Sharova E.I., Akopian T.A., Selezneva O.V., Kostryukova E.S., Malyugin B.E. CTG18.1 Expansion is the Best Classifier of Late-Onset Fuchs' Corneal Dystrophy Among 10 Biomarkers in a Cohort From the European Part of Russia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018; 59(11):4748-4754.