

**Областное казенное учреждение "Агентство по  
инновациям и развитию"**

**ФГБОУ ВПО "Воронежский государственный  
университет"**

**Автономная некоммерческая организация "Научно-  
исследовательский институт постгеномных  
технологий"**

Международная научная конференция  
Постгеномные технологии в медицине: от теории к  
практике

**Сборник тезисов**

Воронеж  
2-3 ноября 2015 года

**Международная научная конференция  
Постгеномные технологии в медицине: от теории  
к практике. Сборник тезисов. - Воронеж, 2015. - 135  
страниц**

В сборнике представлены тезисы работ, соответствующие тематике конференции, по секциям “Молекулярно-генетические основы диагностики социально-значимых заболеваний”, “Теоретические основы применения постгеномных технологий для лечения онкологических и других заболеваний”, “Практический опыт использования постгеномных технологий в медицине”, “Правовые и этические аспекты использования постгеномных технологий в медицине”.

Состав редколлегии: В.Н. Попов, С.В. Поярков, А.Ю. Ащеулов

Доклады сборника издаются в авторской редакции.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕННО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА АНТИОНКОРАН-М НА МЫШАХ С МЕТАСТАЗИРУЮЩЕЙ САРКОМОЙ .....	6
Алексееенко И.В., Безбородова О.А., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И., Свердлов Е.Д	
ВОЗМОЖНОСТИ ПОСТГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КОСМИЧЕСКОЙ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НЕВЕСОМОСТИ .....	12
Атякшин Д.А., Будневский А.В.	
РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ПАНЕЛИ ДЛЯ ТАРГЕТНОГО РЕСЕКВЕНИРОВАНИЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ЗНАЧИМЫХ МУТАЦИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ.....	16
Баринов А.А., Демидова И.А.	
ПРИБРЕТЕННЫЙ СИНДРОМ УДЛИНЕННОГО ИНТЕРВАЛА QT ПРИ ОБСТРУКТИВНЫХ АПНОЭ-ГИПОПНОЭ СНА И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ .....	18
Бородин Н.В., Лышова О.В.	
О ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МАРКЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ В АСПЕКТЕ ПОСТГЕНОМНЫХ СОБЫТИЙ В КЛЕТКЕ. ....	22
Будневский А. В., Атякшин Д. А., Боев К. В., Василенко Д. В.	
ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАБОТОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ ДАННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ. ....	24
Бяхова М.М., Тагирова М.К.	
ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК И АКТИВНОСТЬ КАСПАЗ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА И ДЕЙСТВИИ ЭПИФАМИНА .....	27
Веревкин А.Н., Агарков А.А., Попова Т.Н.	
ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ КОЖИ .....	32
Ганчева П.Г., Костарной А.В.	
РЕЗУЛЬТАТЫ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ 500 ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАБОТОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, ПОЛУЧЕННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ NANOSTRING TECHNOLOGIES, У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ, БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ, УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ. ....	37
Горбачева Д.В., Биджиев А.З., Тагирова М.К.	
МУТАЦИОННЫЙ ЛАНДШАФТ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО ПОЧЕЧНОКЛЕТОЧНОГО РАКА В ПОПУЛЯЦИИ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ.....	40
Горбачева Т.М., Солодских С.А., Паневина А.В., Башмаков В.Ю., Михайлов А.А., Ащеулов А.Ю., Маслов А.Ю., Попов В.Н.	

ПРИНЦИПЫ ПОЛИМЕРОМИКИ В БИМЕДИЦИНСКОМ ПОСТГЕНОМНОМ МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНОМ АНАЛИЗЕ.....	43
Градов О.В.	
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЯДЕРНОГО И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА И ТЕРАПИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЙ.....	56
Гуреев А.П. , Шафоростова Е.А., Попов В.Н.	
МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК КАК ВОЗМОЖНЫЙ БИОМАРКЕР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РИСКА РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА.....	60
Епринцев А.Т., Селиванова Н.В.	
АППОТОТИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА ENDOG ВЫЗЫВАЕТ СИНТЕЗ НЕАКТИВНОЙ ФОРМЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ И ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК .....	65
Жданов Д.Д., Соколов Н.Н., Фами Т., Баснакьян А.Г.	
ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В КОНСЕРВАТИВНОМ М2Е-ЭПИТОПЕ ВИРУСА ГРИППА А, РАСПОЛОЖЕННОМ НА ПОВЕРХНОСТИ ХИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ВТМ, НА ИНФЕКЦИЮ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ В РАСТЕНИЯХ И ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ КАНДИДАТНЫХ НАНОВАКЦИН.....	69
Петухова Н.В., Гасанова Т.В., Курчашова С.Ю., Иванов П.А.	
МЕТАСТАТИЧЕСКОЕ ПОРАЖЕНИЕ ПЕЧЕНИ - МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ.....	73
Каганов О.И. , Козлов С.В., Ткачев М.В., Швец Д.С., Козлов А.М.	
МОНИТОРИНГА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ОНКОМАРКЕРОВ .....	77
Каганов О.И. , Козлов С.В., Ткачев М.В., Швец Д.С., Козлов А.М.	
ОСОБЕННОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОГОПРОТЕОМА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ .....	81
Котенева Е.А., Печковский Г.А., Котенев Е.С., Аксенова Л.Ю., Гнусарева О.А.	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ЗВЕНЬЕВ ПАТОГЕНЕЗА ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ 500 ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАБОТОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ NANOSTRING TECHNOLOGIES...84	
Лунькова А. А., Тагирова М.К.	
СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩАЯ ДНК КРОВИ КАК БИОМАРКЕР МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ.....	87
Паневина А.В.,Горбачева Т.М.,Башмаков В.Ю.,Солодских С.А.,Ащеулов А.Ю.,Михайлов А.А., 2 Мошуров И.П.,Маслов А.Ю.,Попов В.Н.	
ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАКСЕНА НА СТЕПЕНЬ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК И АКТИВНОСТЬ КАСПАЗ У БОЛЬНЫХ С ГЕПАТИТАМИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ.....	89
Попов С.С., Шульгин К.К., Агарков А.А.	
ПРИМЕНЕНИЕ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ ПОСЛЕ РАДИКАЛЬНОЙ МАСТЭКТОМИИ .....	94
Савельев В.Н., Козлов С.В., Ткачев М.В., Борисов А.П., Кочетков Р.И., Каганов О.И.	

ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ПАНТОГАМА, СУКЦИНАТА И ХИТОЗАНА НА СТЕПЕНЬ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННОМ ИШЕМИЕЙ/ РЕПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА .....	98
Сафонова О.А., Попова Т.Н.	
БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ АНТИБИОТИКА ЦЕФАЛОТИНА РЕКОМБИНАНТНОЙ СИНТЕТАЗОЙ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ-КИСЛОТ .....	103
Скляренко А.В., Чеперигин С.А., Медведева Н.В., Жгун А.А., Сатарова Д.Э., Сидоренко А.И., Думина М.В., Эльдаров М.А., Козлов Д.Г., Яроцкий С.В.	
ТРАНСКРИПТОМНЫЙ И ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ КЛЮЧЕВЫХ ПРИЧИН ИЗМЕНЕНИЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КАНОНИЧЕСКИХ СИГНАЛЬНЫХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ НА ПРИМЕРЕ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ.....	110
Солодских С.А., Паневина А.В., Башмаков В.Ю., Горбачева Т.М., Ащеулов А.Ю., Михайлов А.А., Мошуров И.П., Маслов А.Ю., Попов В.Н.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА IN SITU ГИБРИДИЗАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ .....	114
Суркова Е.И. , Сурков К.В., Елагина М.И.	
ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАБОТОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА .....	120
Тагирова М.К., Бяхова М.М., Богданова О.В.	
МИРОВ – БАЗА ДАННЫХ ПО НЕКОДИРУЮЩИМ РНК И КОМПЛЕКСНЫЙ ИНСТРУМЕНТ АНАЛИЗА И ВИЗУАЛИЗАЦИИ ГЕННЫХ СЕТЕЙ.....	122
Фокин А.В., Поярков С.В., Иванков М.Ю., Сорокина С.Ю., Купцов В.Н., Куликов А.М.	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СПЛАЙСОСОМНЫХ БЕЛКОВ TRAP150 И BCLAF1 В КАЧЕСТВЕ РЕЦЕПТОРОВ УБИКВИТИНА .....	126
Чернорудский А.Л.	
МИКРОРНК В КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ .....	130
Шубин В.П.	

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕННО- ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА АНТИОНКОРАН-М НА МЫШАХ С МЕТАСТАЗИРУЮЩЕЙ САРКОМОЙ

Алексеев И.В.<sup>1,2</sup>, Безбородова О.А.<sup>3</sup>, Немцова Е.Р.<sup>3</sup>, Якубовская  
Р.И.<sup>3</sup>, Свердлов Е.Д.<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>*Институт молекулярной генетики РАН*

<sup>2</sup>*Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова РАН*

<sup>3</sup>*Московский научно-исследовательский онкологический институт  
им. П.А.Герцена*

**Аннотация.** Разработан противоопухолевый генно-терапевтический препарат АнтионкоРАН-М, в экспериментах *in vivo* показана его противоопухолевая эффективность.

**Ключевые слова:** генная хирургия, иммунотерапия, рак, HSVtk, GM-CSF

Рак представляет собой одну из наиболее серьезных проблем медицины: он занимает второе место по смертности в мире и, по прогнозам, имеет перспективу перейти на первое. Одной из важных стратегий генной терапии злокачественных новообразований является терапия с использованием, так называемых, генов-убийц (генная хирургия). Генная хирургия направлена на уничтожение опухолевых клеток, путем использования их свойств, которые характерны для всех раковых клеток, например, повышенная скорость митотических делений. Подход заключается в доставке в раковые клетки генов-убийц, кодирующих фермент, который в клетках, где он экспрессируется, модифицирует свой субстрат, превращая его из нетоксичного пролекарства в токсин [1].

Генная хирургия является двустадийной. На первом этапе в опухолевые клетки вводится ген-убийца, на втором -

пролекарство, которое под действием фермента, образующегося в результате экспрессии гена-убийцы, превращается в токсин внутри раковых клеток, что значительно уменьшает токсичность терапии. Токсин может высвободиться из клетки, экспрессирующей ген-убийцу, и проникать в соседние клетки, вызывая их гибель, что многократно усиливает терапевтический эффект. Данное явление получило название «эффекта свидетеля» [2]. Наиболее перспективными в настоящее время являются две системы ген-убийца/пролекарство, обладающие «эффектом свидетеля» и достигшие поздних стадий клинических испытаний: тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSVtk)/ганцикловир (GCV) и цитозиндезаминаза/5-фторцитозин.

Эффективность системы HSVtk/GCV для лечения широкого спектра опухолей была показана в экспериментах на животных. Однако в клинических испытаниях на пациентах пока получают худшие результаты, чем на животных. В значительной степени это связано с недостаточно высоким уровнем «эффекта свидетеля» при проведении испытаний на пациентах. «Эффект свидетеля» может быть дополнительно усилен за счет работы иммунной системы, поскольку гибель раковых клеток и высвобождение из них опухолевых антигенов активируют способность иммунной системы уничтожать раковые клетки, которые не экспрессируют ген-убийцу.

Таким образом, эффективность действия системы ген-убийца/пролекарство можно повысить, стимулируя противоопухолевый иммунный ответ, например, с помощью цитокинов. В ряде работ показано, что регрессия опухоли значительно возрастает при совместном использовании гена-убийцы и отдельно вводимого в виде белка цитокина, в частности, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [3]. Предполагается, что совместная экспрессия гена-убийцы и GM-CSF в клетках опухоли будет приводить к уничтожению раковых клеток и высвобождению из них опухолевых антигенов, которые будут эффективно представляться GM-CSF-активированными антиген-представляющими клетками Т-клеткам иммунной системы, обеспечивая активацию специфического

противоопухолевого иммунитета, в результате чего возрастет гибель опухолевых клеток и снизится вероятность возникновения метастазов. Нами был разработан новый генно-терапевтический препарат АнтионкоРАН-М, который представляет собой комплекс генной конструкции, содержащей под контролем одного ген-убийцу HSVtk и ген цитокина GM-CSF, и блок-сополимера ПЭГ (полиэтиленгликоль)-ПЭИ (полиэтиленимин). Для облегчения проникновения в клетки к блок-сополимеру ПЭИ-ПЭГ дополнительно присоединен фрагмент ТАТ-белка, повышающий эффективность проникновения блок-сополимера в клетки.

Белок HSVtk обладает способностью фосфорилировать нуклеозидный аналог ганцикловир (GCV) до ганцикловирмонофосфата. Последующее его фосфорилирование осуществляется посредством клеточных киназ с образованием ганцикловиртрифосфата, который включается в растущую цепь ДНК во время клеточного деления и терминирует ее синтез, тем самым обеспечивая гибель опухолевой клетки [1]. Вновь образуемый ганцикловиртрифосфат может высвободиться из клетки, в которой он был образован, и проникать в соседние раковые клетки, вызывая их гибель. Образование токсинов внутри раковых клеток и их диффузия в соседние клетки значительно снижает токсичность препарата и увеличивает его терапевтический индекс.

В ходе доклинических испытаний АнтионкоРАН-М показано, что препарат обладает высокой противоопухолевой активностью и низкой токсичностью. Противоопухолевый эффект АнтионкоРАН-М оценивали по уровню торможения роста опухоли (ТРО, %), увеличению продолжительности жизни (УПЖ, %) животных и индексу торможения метастазирования (ТМ, %).

Минимальным критерием активности противоопухолевых препаратов по показателю ТРО является величина  $\geq 50\%$ , по показателю ТМ  $\geq 25\%$ .

Опухолевый штамм саркомы S37 прививали мышам F1 подкожно. Лечение начинали на 7-е сутки роста опухоли, когда опухоль



в среднем имела объем ~ 100 мм<sup>3</sup>. АнтионкоРАН-М вводили внутритопухово 3 раза за курс каждые 5 дней в разовой дозе 0,04 мкг ДНК/мм<sup>3</sup> опухоли. GCV вводили внутривентриально дважды в день в суточной дозе 150 мг/кг в течение 15 дней. Как видно на рисунке 1, внутритопуховое введение препарата АнтионкоРАН-М в сочетании с ганцикловиром приводит к биологически значимому противотопуховому эффекту. Торможение роста опухоли у животных, получавших терапию препаратом составило 86%, увеличение продолжительности

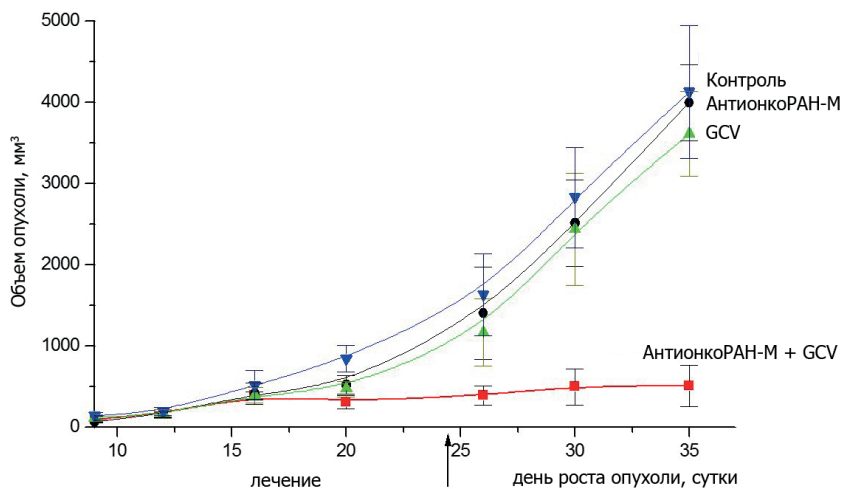


Рис.1. Влияние препарата АнтионкоРАН-М в сочетании с ганцикловиром на рост саркомы S37.

Исследование поддержано грантом Президента России МК-6185.2015.4 и КОМФИ № 13-04-40170-Н.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Genetic surgery - a right strategy to attack cancer/ Sverdlov E.D. // Curr. Gene Ther. – 2011 - Vol. 11(6) – P. 501–531
2. The “bystander effect”: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified / Freeman S.M. [et al.] // Cancer Res. – 1993 – Vol. 53(21) – P. 5274–5283
3. Combined suicide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene therapy induces complete tumor regression and generates antitumor immunity// Jones R.K. [et al.], Cancer Gene Ther. – 2000 – Vol. 7(12) – P. 1519–1528.

*Алексеенко Ирина Васильевна — научный сотрудник Института молекулярной генетики РАН, научный сотрудник Института биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, к.б.н.; тел.: (495) 3306992; e-mail: irina.alekseenko@mail.ru*  
*Alekseenko Irina V - M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, RAS - research fellow. Institute of Molecular Genetics, RAS - research fellow. PhD, tel: (495)3306992, irina.alekseenko@mail.ru*

*Безбородова Ольга Алексеевна — старший научный сотрудник Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А.Герцена, к.б.н.; тел.: (495) 9458716; e-mail: olgabezborodova@yandex.ru*  
*Bezborodova Olga A - Moscow Hertsen Research Institute of Oncology - senior research fellow, PhD, tel (495) 9458716, olgabezborodova@yandex.ru*

*Немцова Елена Романовна — ведущий научный сотрудник*

*Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А.Герцена, д.б.н.; тел.: (495) 9458716; e-mail: nemtz@yandex.ru*

*Nemtsova Elena R - Moscow Hertsen Research Institute of Oncology - senior research fellow, doctor of biological Sciences, tel (495) 9458716, nemtz@yandex.ru*

*Якубовская Раиса Ивановна —зав. отделением Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А.Герцена, д.б.н., проф.; тел.: (495) 9458716; e-mail: nemtz@yandex.ru*

*Yakubovskaya Raisa I. - Head of the Department of Moscow Hertsen Research Institute of Oncology, doctor of biological Sciences, Professor*

*Свердлов Евгений Давидович, академик РАН, советник РАН в Институте молекулярной генетики РАН, зав. Лабораторией структуры и функций генов человека ИБХ РАН, тел.: (495) 3306992; e-mail: edsverd@gmail.com*

*Sverdlov Eugene D., member of the academy of sciences, Professor, Scientific Advisor of Russian Academy of Sciences at the Institute of Molecular Genetics RAS, head of Laboratory of human genes structure and functions of M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, RAS, tel.: (495) 3306992; e-mail: edsverd@gmail.com*

# **ВОЗМОЖНОСТИ ПОСТГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КОСМИЧЕСКОЙ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НЕВЕСОМОСТИ**

**Атякшин Д.А., Будневский А.В.**

*Воронежский государственный медицинский университет имени  
Н.Н.Бурденко  
НИИ экспериментальной биологии и медицины*

Развитие космонавтики неизбежно связано с увеличением длительности полетов человека как в ближний, так и в дальний космос. Такие перспективы оставляют за невесомостью, среди прочих факторов, ведущие позиции по значимости для состояния здоровья космонавтов. Большой объем исследований по проблемам питания и пищеварения в орбитальных полетах обусловил формирование нового направления в космической биологии и медицине – космическую гастроэнтерологию, созданную трудами отечественных ученых (Смирнов К.В., Уголев А.М., 1981, 1997). Накопленный фактический материал показал, что орбитальные полеты могут приводить к различным изменениям в желудочно-кишечном тракте космонавтов, которые отражаются на морфофункциональном состоянии желудка, кишечника, печени, поджелудочной железы и др.

Необходимость эффективного решения медико-биологических проблем длительных экспедиций человека в космос сделала актуальным проведение полетных экспериментов на животных, результаты которых позволили сформулировать основополагающие механизмы развития адаптивных перестроек в условиях невесомости. Эти изменения возникают на разных

уровнях организации живой материи, в т.ч. на субклеточном, клеточном, тканевом и организменном. Поскольку система пищеварения является одной из систем организма, лимитирующих пребывание человека в экстремальных условиях, продиктованы временем дальнейшие исследования механизмов реализации биологических эффектов факторов космического полета.

Существенное расширение экспериментальных возможностей ученых сегодня связано с высокотехнологичными решениями в областях науки, медицины, образования, промышленности и разработкой высококлассного оборудования ведущими компаниями в мире, использующих новейшие технологии и инновации. Модернизация комплекса научной приборной базы позволяет повысить качество результатов поисковых исследований, открывать новые тенденции дизайна эксперимента, повышая информативность и расширяя интерпретацию полученных ранее качественных и количественных данных. Современные достижения квантовой физики, молекулярной биологии и иммунной гистохимии делают возможным проводить молекулярный анализ клеточных и тканевых структур при морфологическом исследовании, что в сочетании с использованием омиксных технологий (геномикой, протеомикой, липидомикой, транскриптомикой, метаболомикой и др.) способствует дальнейшему раскрытию биологических эффектов невесомости на субклеточном уровне. Применение данного подхода в космической биомедицине существенно усиливает возможности познания причин и механизмов адаптивных перестроек различных систем организма во время кратковременных и длительных орбитальных полетов. В этой связи среди приоритетных задач НИИ экспериментальной биологии и медицины ВГМУ им. Н.Н. Бурденко находится высокоселективная идентификация биомаркеров клеточных функций и других тканевых структур на молекулярном уровне. К настоящему времени выполнена пробоподготовка биоматериала для дальнейшего исследования органов желудочно-кишечного тракта монгольских песчанок после 12-суточного космического

полета на КА «Фотон-М3» и 30-суточного орбитального полета мышей C57 black на биоспутнике «БИОН-М №1», а также млекопитающих из наземных экспериментов по моделированию физиологических эффектов невесомости. Особую значимость в космической гастроэнтерологии приобретает изучение межклеточных и межтканевых взаимодействий, исследование экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани. Важнейшее значение интерстиция в органах связано с выполнением интегрирующей, трофической, биомеханической, морфогенетической, пластической, защитной и других функций, которые обеспечивают необходимые условия для функционирования клеточных дифферонов, процессов морфогенеза в норме и патологии. Определение изменений состояния коллагеновых, ретикулярных и эластических волокон, интегративно-буферной метаболической среды с гликоконъюгатами, белками плазмы, фибриллинами, предшественниками волокнистых белков и других компонентов открывает новую страницу в понимании механизмов адаптивного ремоделирования соединительной ткани в условиях невесомости. Иммуногистохимическое исследование клеточных элементов соединительной ткани, прежде всего, тучных клеток предоставляет новые данные для идентификации способов поддержания гомеостаза на локальном уровне, тем более, что пусковыми факторами развития тканевых реакций в невесомости является изменение гемодинамических условий. Важное значение в регуляции интенсивности транспорта метаболитов от капилляров до функциональных элементов органа имеет состояние интегративно-буферной метаболической среды интерстиция. Проведение постгеномных исследований паренхимы печени, эпителиальной ткани желудка и кишечника, гладких миоцитов во взаимосвязи со структурно-физиологическим состоянием внеклеточного матрикса соединительной ткани является одной из приоритетных задач космической гастроэнтерологии, имеющей важное значение при подготовке человека к длительным космическим полетам. Кроме того доказано, что волокнистые компоненты межклеточного матрикса соединительной ткани, по

сути выполняя функцию скелета внутренних органов, в условиях измененной гравитации подвергаются специфичным процессам адаптивного ремоделирования (Атякшин Д.А., 2014).

Таким образом, изучение морфофункционального состояния органов пищеварительной системы и структурных компонентов экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани, характеристик тучных клеток с помощью методик иммунной гистохимии и использования конфокальной микроскопии обладает высокой актуальностью для космической гастроэнтерологии. Определение уровня представленности транскриптов технологией ПЦР «в реальном времени» в комбинации с методом обратной транскрипции, а также применение вестерн-блоттинга для анализа белков создадут важный информационный ресурс уникальных данных о состоянии экспрессии соответствующих генов при действии факторов космического полета, в том числе, невесомости. Полученные результаты окажутся востребованными для совершенствования профилактических мероприятий по коррекции функционирования органов пищеварительного тракта космонавтов во время профессиональной деятельности на борту орбитальных станций и в послеполетном периоде.

# РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ПАНЕЛИ ДЛЯ ТАРГЕТНОГО РЕСЕКВЕНИРОВАНИЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ЗНАЧИМЫХ МУТАЦИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

**Баринов А.А., Демидова И.А.**

*ГБУЗ “Московская онкологическая больница №62” ДЗМ*

В настоящее время в клинической практике активно используется геномное профилирование для персонализированного подхода к терапии онкологических заболеваний. Накопленные данные о генетике канцерогенеза позволяют внедрять современные препараты блокаторы, подавляющие функции белковых мишеней, выполняющих ключевые роли в биологических процессах. Активирующие генетические нарушения участвуют в патоморфологических опухолевых процессах, но список известных клинически значимых мутаций ничтожно мал относительно всех выявляемых альтераций. Экзомные панели позволяют выявлять ранее неизвестные варианты, доступные к описанию на основе предиктивных алгоритмов, но не дающих информации о терапевтической значимости, а также не позволяют анализировать результаты с достаточной глубиной прочтения необходимой для выявления соматических мутаций. Напротив мультигенный подход, основанный на анализе последовательности генов или их участков позволяет достигнуть оптимальной глубины прочтения и повысить релевантность полученной информации в клинической практике.

Целью работы являлось разработка высокопроизводительного метода для решения задач по определению клинически значимых активирующих мутаций в кодирующих участках генов, включенных в генетическую панель для мультиплексной



ПЦР для последующего таргентного ресеквенирования операционных образцов и биопсий онкологический заболеваний рака легкого(РЛ), колоректального рака(КРР), меланомы и стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта(семейство ГИСТ).

Была создана генетическая панель в состав которой вошли 23 локуса 8 генов: KRAS(4), NRAS(3), BRAF(1), EGFR(4), ERBB2(1), KIT(6), PDGFRA(2), PIK3CA(2) общего размера 4182 нуклеотидов (3294 смысловых нуклеотидов). Выбор участков интереса осуществлялся на основе рекомендаций по диагностике и назначению таргентных препаратов, данных базы соматических мутаций Cosmic для исследуемых нозологий. Проанализированы 24 образца РЛ(8),КРР(8),Меланомы (2),ГИСТ (2), контрольных образца лейкоцитарной ДНК (4) на приборе Miseq с покрытием 100% и минимальным средней глубиной прочтения не менее 1000х. Выявлено 6 вариантов, клинически значимых генетических альтераций РЛ (3),КРР (2), ГИСТ (1).Полученные данные были подтверждены и свидетельствуют о высокой конкордантности предложенного метода относительно других методов генотипирования: ПЦР с аллель-специфическими зондами, плавление с высоким разрешением (HRM), секвенирование по Сэнгеру. Результаты позволяют рассматривать предложенный метод в качестве универсального подхода для выявления клинически значимых мутаций для исследуемых нозологий.

**ПРИБРЕТЕННЫЙ СИНДРОМ УДЛИНЕННОГО  
ИНТЕРВАЛА QT  
ПРИ ОБСТРУКТИВНЫХ АПНОЭ-ГИПОПНОЭ СНА  
И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

**Бородин Н.В., Лышова О.В.**

*ГБОУ ВПО «ВГМУ им. Н.Н. Бурденко» МЗ РФ*

**Аннотация.** Приобретенный синдром удлиненного интервала QT ассоциируется с риском развития внезапной сердечной смерти. Оценена выявляемость удлиненного корригированного интервала QT (450 мс и более) у мужчин с впервые диагностированным синдромом обструктивного апноэ-гипопноэ сна. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости изучения молекулярно-генетических вариантов приобретенного удлинения корригированного интервала QT. Эти данные в будущем позволят осуществлять персонафицированный подход при ведении данной категории пациентов, прогнозировать и стратифицировать риск развития неблагоприятных исходов.

**Ключевые слова:** удлиненный интервал QT, синдром обструктивного апноэ-гипопноэ сна, артериальная гипертензия.

**ACQUIRED LONG QT SYNDROME  
IN OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA-HYPOPNEA AND  
ARTERIAL HYPERTENSION**

**N.V. Borodin, O.V. Lyshova**

*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko*

**Abstract.** The acquired long QT syndrome is associated with the risk of sudden cardiac death. The detectability of long corrected QT interval (450 ms or more) in men with newly diagnosed obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome and arterial hypertension was estimated. Obtained results are evidenced that molecular and genetic variants of acquired long corrected QT syndrome needs further research. These data will allow personal approach in patients management, to predict and to stratify the risk of adverse outcomes in the future.

**Key words:** long QT interval, obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, arterial hypertension.

**Актуальность.** Приобретенный синдром удлиненного корригированного интервала QT или QTc (450 мс и более) ассоциируется с риском развития внезапной сердечной смерти [1]. В настоящее время синдром обструктивного апноэ-гипопноэ сна (СОАГС) в сочетании с артериальной гипертензией (АГ) обсуждается в качестве одной из причин удлинения интервала QTc. Однако детальные патогенетические механизмы находятся на начальной стадии изучения [2]. Вероятно, при СОАГС интермиттирующая гипоксия способствует развитию определенных условий для изменения экспрессии генов. Это доказывают исследования маркеров раннего атеросклероза у больных СОАГС [3,4]. Кроме того, СОАГС сопровождается тревожно-депрессивными расстройствами, которые являются неотъемлемыми компонентами хронического стресса. Недавно опубликованные исследования показали взаимосвязь хронического стресса с укорочением теломер и развитием преждевременного старения [5].

**Цель.** Изучить выявляемость удлиненного интервала QTc у мужчин с впервые диагностированными СОАГС и АГ.

**Материал и методы.** 24-х часовое полифункциональное исследование с кардиореспираторным мониторингом во время сна («Кардиотехника-07», ИНКАРТ, Россия) провели у 141 пациента (все мужчины) с уровнем офисного артериального давления (АД) 140 и/или 90 мм рт. ст. и более, а также жалобами на храп. Средний возраст  $40,4 \pm 6,9$  лет; индекс массы тела

34,5±4,7 кг/м<sup>2</sup>. У всех пациентов отмечали наличие 3-х и более факторов риска развития АГ. АГ 1-й степени выявили у 104 (73,8%), 2-й – у 26 (18,4%) и 3-й – у 11 (7,8%). Субклиническое поражение органов-мишеней диагностировали у 50 (35,5%). Всех пациентов разделили на 2 группы: 1-ю группу (n=36) составили пациенты без СОАГС (группа контроля, индекс апноэ-гипопноэ или ИАГ менее 5/ч), 2-ю (n=107) – с СОАГС (ИАГ 5-97/ч). Статистическую обработку данных провели в программе Statistica 10. Межгрупповые различия по абсолютным значениям признака оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, по частоте (процентам) – хи-квадрат Пирсона. Силу корреляционной связи – по Спирмену. Значения  $p < 0,05$  считали достоверными.

**Результаты.** Анализируемые группы оказались сопоставимы по возрасту (38,5±7,5 против 40,9±6,6 лет), времени сна (7,6±1,1 против 7,7±1,4 ч), средним значениям систолического АД (днем 137,7±10,3 против 142,7±16,6 мм рт. ст. и ночью 122,7±12,6 против 129,1±20,0 мм рт. ст.) и индексу миокарда левого желудочка (112,3±24,5 против 111,6±22,7 г/м<sup>2</sup>). В отличие от группы контроля, во 2-й группе наблюдались достоверно наибольшие средние значения диастолического АД (днем 81,1±7,1 против 85,9±11,4 мм рт. ст. и ночью 65,9±9,2 против 74,4±13,2 мм рт. ст.), среднесуточный интервал QTc (409,9±17,4 против 417,6±23,1 мс), а также наименьшая средняя сатурация кислорода или SpO<sub>2</sub> (93,4±1,4 против 91,7±2,8 %). Однако различий по выявляемости удлиненного интервала QTc не установлено (38,2 против 42,9%). Определена достоверная корреляционная связь среднесуточного интервала QTc с ИАГ и SpO<sub>2</sub> ( $r=0,24$ ;  $r=-0,27$ ).

**Выводы.** Выявляемость удлиненного интервала QTc у мужчин с впервые диагностированными СОАГС и АГ, по сравнению с группой контроля, не различалась. Среднесуточные значения интервала QTc коррелировали с увеличением степени тяжести СОАГС, которую характеризуют индекс апноэ-гипопноэ и уровень сатурации кислорода во время сна. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости изучения молекулярно-генетических вариантов приобретенного удлинения интервала QTc. Эти данные позволят в будущем осуществлять

персонализированный подход при ведении данной категории пациентов, прогнозировать и стратифицировать риск развития неблагоприятных исходов.

1. Бокерия Л.А. Синдром удлиненного интервала QT – клиника, диагностика и лечение / Л.А. Бокерия, А.Ш. Ревшвили, И.В. Проничева // Анналы аритмологии. – 2005. – Т. 2, № 4. – С. 7-17.
2. Бородин Н.В. Удлиненный интервал QT и синдром обструктивного апноэ-гипопноэ сна / Н.В. Бородин, О.В. Лышова // Вестник Аритмологии. – 2015. – № 80. – С. 49-56.
3. Hoffmann M.S. Obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia increase expression of dual specificity phosphatase 1/ [M.S. Hoffmann et al.]. // Atherosclerosis. – 2013. – Vol. 231, 2. – P. 378-383.
4. Bielicki P. Cytokine gene polymorphisms in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome / [P. Bielicki et al.] // Sleep Med. – 2015 – Vol. 16, № 6 – P. 792-795.
5. Драпкина О.М. Длина теломер и сердечно-сосудистые заболевания: акцент на хронический психологический стресс / О.М. Драпкина, Р.Н. Шепель // Кардиология: новости, мнения, обучение. – 2015. – № 2. – С. 48-53.

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко*

*Бородин Николай Валериевич, аспирант кафедры факультетской терапии*

*bor\_nv89@mail.ru  
Тел.: (980)553-60-43*

*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko*

*Borodin Nikolai V., MD, PhD student,  
Department of the Faculty Therapy*

*bor\_nv89@mail.ru  
Tel.: (980)553-60-43*

# О ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МАРКЕРНЫХ ФЕРМЕНТОВ В АСПЕКТЕ ПОСТГЕНОМНЫХ СОБЫТИЙ В КЛЕТКЕ.

**Будневский А. В., Атякшин Д. А., Боев К. В., Василенко Д. В.**

*ГГБОУ ВПО Воронежский государственный медицинский  
университет имени Н.Н.Бурденко*

В апреле 2000 года было сообщено о расшифровке человеческого генома. К этому времени были инвентаризованы все гены, картированы все хромосомы.

Болезни человека так или иначе связаны с геномом. Заболевания можно разделить на две группы: одна – результат дефекта структуры гена, другая – результат нарушения экспрессии генов генома человека.

Однако, если ген представляет собой конкретную информацию, то белок – непосредственно работающая «машина». Поэтому возникает насущная проблема: инвентаризация всех белков организма. Именно такую задачу ставит перед собой наука – протеомика.

В круг интересов протеомики входит составление протеомных карт клеток, биологических жидкостей и тканей. Интерес к данному вопросу понятен: если геномика установила закономерности реализации информации на уровне трансляции, то это еще не означает, что сам “рабочий механизм” - белок всегда находится в функционально-активном состоянии. Сравнение функций белков и пептидов внутри клеток, в биожидкостях до и после воздействий, в норме и патологии, оценка биологической активности альтерированных молекул даст новый толчок развитию методов диагностики и терапии заболеваний. Наиболее интересными в плане диагностики и мониторинга

патологического процесса, а также последующей терапии являются ферменты.

К 80 – м годам прошлого века уже была установлена локализация в клетке важнейших маркерных ферментов. (Д. Вилкинсон Принципы и методы диагностической энзимологии. М. « Медицина» 1981, С. 24, 623 с.).

Так, аланинаминотрансфераза (К.Ф.2.6.1.2), лактатдегидрогеназа (К.Ф.1.1.1.27) находятся в цитоплазме. Гамма-глутамилтрансфераза (гамма-глутамилтранспептидаза К.Ф.2.3.2.2) и щелочная фосфатаза (К.Ф.3.1.3.1) ассоциированы с клеточной мембраной. В то время как аспаратаминотрансфераза (К.Ф.2.6.1.1) и креатинкиназа (КК, К.Ф.2.7.3.2) локализованы в митохондриях. (Л. А. Данилова Анализ крови и мочи. Медкнига. С.-П., 2001.С. 59-63., 123с.).

Именно регистрируемая в крови активность ферментов является определяющим фактором при диагностике заболеваний. Тем не менее, в связи с этим уместны два вопроса. Первый: увеличение активности маркерного фермента в крови – результат массивного цитолиза. Второй: увеличение количества молекул фермента в крови – результата адаптационного возрастания активности соответствующих генов на патофизиологический процесс.

В этой связи перспективным является контроль за процессом синтеза белков – ферментов внутри клетки с помощью иммуноферментных методов исследования и объективная оценка процесса синтеза соответствующих матричных РНК с помощью методов ПЦР-диагностики.

**ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ  
ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ГЕНОВ,  
АССОЦИИРОВАННЫХ С РАБОТОЙ ИММУННОЙ  
СИСТЕМЫ, ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ  
ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕЙ ДИАГНОСТИКИ И  
ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ ДАННОГО  
ЗАБОЛЕВАНИЯ.**

**Бяхова М.М., Тагирова М.К.**

*ФГБУ НИИ Экологии человека и гигиены окружающей среды им  
А.Н. Сысина Минздрава России*

Бронхиальная астма (БА) – воспалительное заболевание дыхательных путей, включающее комплекс нарушений, таких как обструкция дыхательных путей и бронхиальную гиперчувствительность, пусковым сигналом которых является реакция иммунокомпетентных клеток на аллергены. Известно, что, будучи мультифакториальным заболеванием, в развитии БА задействованы разные генные сети работы иммунной системы. Одновременный анализ ключевых генов задействованных в разных генных сетях работы иммунной системы позволит понять возможные механизмы отдельных звеньев патогенеза заболевания, выделить группы риска, а так же прогнозировать течение заболевания. Развитие молекулярно-генетических технологий, таких как Nanostring Technologies® и сравнительная гибридизация на ДНК микрочипах (Agilent, Affimetrix) позволяет одновременно анализировать большое количество генов. В данной работе был проведен анализ экспрессии 500 генов, ассоциированных с работой иммунной системы, в периферической крови у больных детей с бронхиальной астмой. Экспрессия генов была определена с помощью технологии Nanostring Technologies®, которая позволяет напрямую детектировать



молекулы РНК и поводить их количественный анализ. Результаты данных экспрессии 500 генов были нормализованы с помощью профиля экспрессии 15 референсных генов (ABCF1, ALAS1, EEF1G, G6PD, GAPDH, GUSB, HPRT1, OAZ1, POLR1B, POLR2A, PPIA, SDHA, TBP, TUBB, RPL19) и статистически обработаны с использованием программы nSolver Nanostring. По оригинальным экспериментальным данным была выявлена статистически значимая повышенная экспрессия у 84 генов, и пониженная экспрессия у 52 генов из 500 генов, взятых для анализа работы иммунной системы, у детей с бронхиальной астмой в сравнение с контрольной группой. Дальнейший анализ генных сетей, баз данных, научных публикаций показал, ассоциацию данных генов с развитием и течением БА. Выявлена работа генной сети врожденного иммунитета (гены CD80, CD40, CSF1, CD244 и тд. ), адаптивного иммунитета ( гены CCR6, CEA-CAM1 и тд.), процессов воспаления и иммунного ответа (гены CLEC5A, SH2D1A, CCR7 IL1RL1, CCL23, CCL2, CCL3 и тд.), гуморального иммунитета ( ген CFD). Повышенная экспрессия генов ARG1 и ARG2 может свидетельствовать о наличии окислительного стресса и воспаления, которые могут быть результатом воздействия факторов внешней среды (загрязнение воздуха). Повышенная экспрессия генов NOS2, CXCL6, CXCL10, GNLY, NOD1 косвенно свидетельствует о возможных причинах аллергии и астмы в результате микробного влияния на организм человека.

Одновременный анализ большого количества генов, ассоциированных с работой иммунной системы, позволяет определить возможные причины развития бронхиальной астмы (виды аллергенов), течения заболевания (стадии БА) и дальнейшее прогнозирование состояния больного с бронхиальной астмой. Выявление групп генов, имеющих повышенную или пониженную статистически значимую экспрессию генов, позволит в будущем предложить быструю диагностику бронхиальной астмы и, возможно, таргетную терапию. По результатам анализа экспрессии генов при БА можно судить о наличии и отсутствии полиморфизмов в данных генах на уровне ДНК, что также

может быть дополнительным инструментом в генетической диагностике данного заболевания. Наши данные подтверждают научные публикации развития и течения бронхиальной астмы, полученные при изучении больных с бронхиальной астмой и модельных животных (крысы, мыши, кролики, собаки).

## **ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК И АКТИВНОСТЬ КАСПАЗ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА И ДЕЙСТВИИ ЭПИФАМИНА**

**Веревкин А.Н., Агарков А.А., Попова Т.Н.**

*ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»*

**Ключевые слова:** сахарный диабет, фрагментация ДНК, каспазы, эпифамин.

В течение последних лет получен ряд экспериментальных данных, что в патогенезе сахарного диабета 2 типа (СД2) важная роль принадлежит свободнорадикальному окислению биомолекул. Аутоокисление глюкозы, активация полиолового пути и гликозилирование белков являются ключевыми причинами нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза при развитии заболевания. Это может послужить причиной инициации процессов запрограммированной клеточной гибели – апоптоза, характеризующегося активацией каскада внутриклеточных цистеиновых протеаз, известных как каспазы. Каспазы – семейство эволюционно консервативных протеаз, специфически расщепляющих белки после остатков аспарагиновой кислоты [1]. В частности, с участием каспазы-3 подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК (CAD). Выбор ткани для исследования был осуществлен с учетом того, что согласно литературным данным при СД печень может подвергаться патологическим изменениям, выражающимся в «диабетическом гепатозе» [2].

Применение новых препаратов в лечении СД2 может

способствовать нормализации процессов свободнорадикального окисления в организме, что будет способствовать снижению интенсивности процесса апоптоза клеток. Так препарат эпифамин – пептидный биорегулятор, тропный к эпиталамо-эпифизарной области – способен осуществлять коррекцию уровня эндогенного мелатонина [3], содержание которого определено во всех клеточных структурах, включая ядро [4]. Один из основных биохимических механизмов действия мелатонина на клетки – антиоксидантный. Универсальность антиоксидантного действия мелатонина, обеспечивающая защиту ДНК, белков и липидов от свободнорадикального повреждения, определяет перспективность исследования антиоксидантных свойств эпифамина.

В качестве объекта исследования использовали белых крыс-самцов (*Rattus rattus* L.) массой 150–200 г. Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными и в соответствии с санитарными правилами для вивария. СД2 индуцировали внутримышечным введением протамина сульфата в течение 3 недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объеме 0,5 мл 0,9% NaCl 3 раза в сутки [5].

В ходе эксперимента животные были разделены на три группы: группу 1 (n = 18) составляли контрольные животные; группу 2 (n = 18) – животные с СД2; в группе 3 (n = 12) животным с СД2 внутрибрюшинно вводили эпифамин в виде раствора в 1 мл 0,9% раствора NaCl трижды в день в дозе 2,5 мг/кг на 15, 17 и 19 день эксперимента. Через 3 недели после начала индуцирования СД2 наркотизированных животных всех экспериментальных групп умерщвляли и использовали для дальнейших исследований.

Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора «К-Сорб» (СИНТОЛ, Россия) согласно инструкции производителя.

Фрагментацию ДНК выявляли путем проведения электрофореза образца ДНК в агарозном геле с использованием буфера трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ).

Определение активности каспаз-1 и -3 проводили с помощью набора реактивов caspase 1 Assay Kit, colorimetric и caspase 3 Assay Kit, colorimetric соответственно (Sigma) на спектрофотометре Hitachi U1900 с программным обеспечением. Активность каспаз выражали в пикомолях продукта, образующегося в 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Достоверными считались различия при  $p \leq 0,05$ .

ДНК, выделенная из печени крыс с СД2, была фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб. По мнению ряда исследователей, подобные фрагменты возникают в терминальной фазе апоптоза при действии апоптоз-специфических нуклеаз [6]. В ходе деградации ДНК сначала происходит образование крупных фрагментов, содержащих примерно 300 тысяч пар оснований, несколько позже - 30-50 тысяч пар оснований. Именно эти фрагменты выявлены в виде “лесенки” при электрофорезе ДНК. В данном процессе важная роль принадлежит протеолитическому расщеплению под действием каспаз топоизомеразы II, белка, выполняющего структурную и ферментативную функции и участвующего в формировании структур ДНК высшего порядка - суперспирализованных петель [7]. При изучении фрагментации ДНК, выделенной из печени крыс с СД2, наблюдалась также высокоподвижная полоса в области низких молекулярных масс, соответствующая деградированной ДНК, наличие которой характерно для процесса некроза [8]. Введение эпифамина животным с СД2 приводило к снижению степени фрагментации ДНК, что может быть свидетельством антиапоптотического действия данного препарата.

Установлено, что в печени животных с экспериментальным СД2

происходит увеличение удельной активности каспазы-1 в 6,0 раза, каспазы-3 – в 2,7 раза. Это свидетельствует об усилении апоптотических процессов в клетках печени. Повышение активности каспазы-3 в печени крыс также отмечено при действии четыреххлористого углерода [9].

При введении эпифамина животным с СД2 наблюдалось уменьшение активности каспазы-1 в печени в 2,4 раза, каспазы-3 – в 1,6 раза по сравнению с соответствующими значениями у животных с СД2, не получавших эпифамин. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о снижении уровня апоптотических процессов в печени крыс с СД2 при действии эпифамина, что, по-видимому, связано со снижением скорости свободнорадикальных процессов при введении эпифамина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куцкий М.П. Участие протеаз в апоптозе / М.П. Куцкий, Е.А. Кузнецова, А.И. Газиев // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – С. 149–163.
2. Стеатоз печени и инсулинорезистентность при хроническом гепатите С / Ж.Ж. Байжанова [и др.] // ФАРМАТЕКА. – 2012. – № 7. – С. 26-29.
3. Пептидергическая регуляция гомеостаза / В.Х. Хавинсон [и др.]. – СПб.: Наука, 2003. – 194 с.
4. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system / R.J. Reiter [et al.] // Ann N Y Acad Sci. – 2001. – V. 939. – P. 200–215.
5. Ульянов А.М. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А.М. Ульянов, Ю.А. Тарасов // Вопросы мед. химии. – 2000. – Т. 46. № 2. – С. 149–154.
6. Muller K. Gp120 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell

cultures: prevention by memantine / K. Muller // Eur. J. Pharmacol. – 1992. – V. 226, № 6. – P. 209-214.

7. Earnshaw W.C. Nuclear changes in apoptosis / W.C. Earnshaw // Curr. Opin. Cell Biol. – 1995. – V. 7. – P. 337-343.

8. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патол. физиол. эксп. терап. – 1998. – Т. 2. – С. 38-48.

9. Фармакотерапевтическая эффективность комплексного растительного средства «гепатон» при экспериментальном повреждении печени / С.В. Лемза [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 72. № 2. – С. 181–184.

# ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ КОЖИ

Ганчева П.Г. , Костарной А.В.

*ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

**Аннотация.** С использованием метода RNA-microarray изучено изменение экспрессии генов паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунного ответа при повреждении кожи. В наибольшей степени повышается экспрессия генов семейства CLRs, из которых наиболее индуцибельны гены Clec4e и Clec4d. Изучен цитокиновый профиль, индуцированный нанесением трегалозы дибегената (лиганда рецепторного комплекса Clec4e/Clec4d) на область раны.

**Ключевые слова:** паттерн-распознающие рецепторы, врожденный иммунный ответ, Clec4e, Clec4d

## CHANGES IN PATTERN RECOGNITION RECEPTORS GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO SKIN INJURY

P.G. Gancheva, A.V. Kostarnoy  
NF Gamaleya FRCM

**Abstract.** Changes in pattern recognition receptors gene expression in response to skin injury were investigated using RNA-microarray. The greatest increases were detected for genes belonging to CLRs



family, and the most inducible are genes Clec4e and Clec4d. Cytokine profile induced by topical application onto wounded skin of trehalose dibehenate, ligand for receptor complex Clec4e/Clec4d, was studied.

**Keywords:** pattern recognition receptors, innate immunity, Clec4e, Clec4d

Микробная флора является обязательным участником процесса заживления ран кожи. Полагают, что микроорганизмы, способствуя воспалению и лизису омертвевших тканей, играют важную роль в очищении от них раневого дефекта; вместе с тем известно, что контаминация раны микроорганизмами может отрицательно сказываться на течении раневого процесса. Важную роль в процессах репарации играет система врожденного иммунного ответа. Паттерн-распознающие рецепторы врожденного иммунитета распознают высоконсервативные молекулярные структуры, характерные для микроорганизмов и вирусов, а также структуры молекул, высвобождаемых или секретируемых в ответ на повреждение ткани. Активация паттерн-распознающих рецепторов приводит к запуску биохимических каскадов, приводящих к активации ряда транскрипционных факторов, регулирующих секрецию спектра цитокинов, хемокинов, антимикробных пептидов, молекул адгезии и других факторов, которые могут влиять на процесс репарации. Важность проведения сигнала через паттерн-распознающие рецепторы для заживления ран была показана с использованием генетически модифицированных животных в нескольких недавно опубликованных работах; в ряде случаев активация паттерн-распознающих рецепторов их лигандами стимулирует процесс репарации [1-5]

Мы поставили перед собой задачу изучить изменение экспрессии генов паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунного ответа при повреждении кожи мышей методом RNA-microarray с использованием микрочипов и оборудования фирмы Affymetrix (США). В эксперименте

участвовали две группы мышей линии Balb/c: на животных первой группы моделировалась рана кожи по известной методике [6]; животным второй группы раневый дефект не наносился. Через 24 часа после моделирования раневого дефекта животные были эвтаназированы. С использованием РНК, выделенной из кожи, содержащей раневый дефект, и интактной кожи, было проведено полногеномное изучение экспрессии генов. Поиск дифференциально экспрессированных генов осуществлялся при помощи критерия Стьюдента, предлагаемого в пакете limma среды bioconductor языка R. Достигаемые уровни значимости критерия были модифицированы методом Бенджамини-Хохберга. В итоговый список были отобраны гены, модифицированный достигаемый уровень значимости которых не превосходил 0.05, а модуль кратности изменения составлял не менее 3. Гены паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунного ответа были сгруппированы по семействам: TLRs (Toll-like receptors), NLRs (NOD-like receptors), CLRс (C-type lectin receptors), RLRs (RIG-I-like receptors).

В результате данного эксперимента было установлено, что в ответ на повреждение кожи в наибольшей степени повышается экспрессия генов семейства CLRс, из которых наиболее индуцибельны гены Clec4e и Clec4d; известно, что белки, кодируемые данными генами, образуют рецепторный комплекс. Результаты эксперимента были валидированы методом RT-PCR. Значительное увеличение белков Clec4e и Clec4d в тканях раны по сравнению с интактной кожей было показано методом иммуноблота.

Имуногистохимическое исследование позволило охарактеризовать фенотип клеток, экспрессирующих рецепторный комплекс Clec4e/Clec4d. Изучена секреция цитокинов в ответ на местное нанесение на область раны трегалозы дибегената (лиганда рецепторного комплекса Clec4e/Clec4d). Нами было показано, что нанесение трегалозы дибегената (лиганда рецепторного комплекса Clec4e/Clec4d) на

область повреждения приводит к значительному увеличению секреции провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) в тканях раны.

В дальнейшем планируется исследование влияния стимулирования активации рецепторного комплекса Clec4e/Clec4d на процесс ранозаживления.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-5205.2015.7)

1. Impaired wound healing with defective expression of chemokines and recruitment of myeloid cells in TLR3-deficient mice / Q. Lin [et al.] // J Immunol. – 2011. – Vol. 186(6). – P. 3710-7.

2. Wound healing is impaired in MyD88-deficient mice: a role for MyD88 in the regulation of wound healing by adenosine A2A receptors / L. Macedo [et al.] // Am J Pathol. – 2007. – Vol. 171(6). – P. 1774-88.

3. The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice / U. Deiters [et al.] // Exp Dermatol. – 2004. – Vol. 13(12). – P. 731-9.

4. Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid promotes wound healing in human and murine skin / Q. Lin [et al.] // J Invest Dermatol. – 2012. – Vol. 132(8). – P. 2085-92.

5. Topical bacterial lipopolysaccharide application affects inflammatory response and promotes wound healing / A. Kostarney [et al.] // J Interferon Cytokine Res. – 2013. – Vol. 33(9). – P. 514-22.

6. Effect of Cytomodulin-10 (TGF-beta1 analogue) on wound healing by primary intention in a murine model / S. Basu [et al.] // Int J Surg. – 2009. – Vol. 7(5). – P. 460-5.

*ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации NF Gamaleya FRCEM*

*Костарной Алексей Викторович, с.н.с. лаб. иммунобиотехнологии  
kostarnoy@yandex.ru  
Тел.: +7(967)145-27-18*

*Kostarnoy Alexey V., senior scientist of the Laboratory of Immunob-  
iotechnology kostarnoy@yandex.ru  
Tel.: +7(967)145-27-18*

# **РЕЗУЛЬТАТЫ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ 500 ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАБОТОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, ПОЛУЧЕННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ NANOSTRING TECHNOLOGIES, У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ, БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ, УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ.**

**Горбачева Д.В.<sup>1</sup>, Биджиев А.З.<sup>2</sup>, Тагирова М.К.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова*

*<sup>2</sup>Московский Научно-Практической Центр*

Современные молекулярно-генетические методы измерения уровня экспрессии генов - сравнительная гибридизация на ДНК-микрочипах (Agilent, Affimetrix), цифровой анализ нуклеиновых кислот (Nanosttring Technologies), РНК-секвенирование (Illumina) - требуют обработки больших массивов данных.

В данной работе был проведен статистический и биоинформатический анализ профиля экспрессии 500 генов, ассоциированных с работой иммунной системы, полученный с помощью цифрового анализа нуклеиновых кислот по технологии Nanosttring Technologies, у детей с различными заболеваниями иммунной системы (атопический дерматит, бронхиальная астма, хроническая крапивница). Умственная отсталость была взята для подтверждения или опровержении теории развития умственной отсталости в результате нарушения работы иммунной системы. Биоинформатическая обработка данных была проведена с использованием программ: nSolver Nanosttring, R – и доступных

баз данных: NCBI Gene, GeneMania.

Наиболее наглядный и удобный способ отображения нормализованного профиля экспрессии генов – тепловая карта (HeatMap), которая позволяет объединять по одинаковым значениям экспрессии гены в группы, которые могут быть показателями звеньев патологического процесса при развитии заболевания. Тепловые карты позволяют выявлять как сходные и разные звенья патогенеза, так и различия между болезнями, если одновременно анализируется профиль одних и тех же генов при разных заболеваниях.

Для бронхиальной астмы наблюдалась статистически значимая повышенная экспрессия генов IL6, CD80, PD6FRB, CD8B, CCR5, CX3CR1, CXCR6, IKZF2, TNFRSF13C, SMAD3, TP53, CD79B, MS4A1, CD22, IDO1, IL1RL1, CD40, CD24, NT5E, PAX5, CCRG, HLA-DOB, IL2RA, CSF1, CCL23, CR2, CCL2, NOD1, CCL4.

При хронической крапивнице сильнее экспрессировались гены IT6A6, CD19, SIPA, CUL9, IL16, HLA-DQB1, HLA-DQA1, PPBD, POU2F2, ICOSLG, IL2RB, MAP4K2 и слабее – гены CX3CR1, PCMC2, CCL5, TBX21.

Атопический дерматит характеризовался повышенным уровнем экспрессии CCRL2, IL1R1, C4BPA, CXCL2, MARCO, SCTLA4, TNFSF518, ATG12, CLEC6A, BST2. Для тяжелого атопического дерматита была замечена дополнительная повышенная экспрессия IL6, CD80, PD6FRB, CD8B, CD9, LAIR1, CFD, HLA-DMA, PTPN2, FCERIA и пониженная – TCF7, GNLY, LEF1, IL7R, TP53, TNFRSF13C, IKZF2, MALT1, NFATC2, STAT4, GRP183, что свидетельствует о запуске работы других генетических сетей.

При тяжелом атопическом дерматите и умственной отсталости наблюдалось усиление экспрессии CD83, SOCS3, LILRA5, S100A9, LY96, MME, BCL6, NFKBIZ, MAPK1, NCF4, STAT5B, FC6R, TLR8, CD44, CASP1, CD58, CXCL1, ITGAM, ICAM3,

LITAF, STAT3. Те же гены при бронхиальной астме имели статистически значимую пониженную экспрессию.

При умственной отсталости был понижен уровень экспрессии генов HLA-DPB1, HLA-DPA1, HLA-DMB, HLA-DRA, HLA-DQB1, HLA-DQA1.

Дальнейший анализ выявленных групп генов в публичных базах данных, показал их участие в генных сетях врожденного, приобретенного иммунитета, воспаления, апоптоза. Биоинформатическая обработка данных по экспрессии генов при различных заболеваниях позволяет выявлять группы генов, объединенных статистически значимым повышением или понижением экспрессии в сравнении с контролем, которые в дальнейшем могут быть выбраны для понимания течения, диагностики заболевания, и в дальнейшем для таргетной терапии.

# МУТАЦИОННЫЙ ЛАНДШАФТ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО ПОЧЕЧНОКЛЕТОЧНОГО РАКА В ПОПУЛЯЦИИ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Горбачева Т.М.<sup>1,4</sup>, Солодских С.А.<sup>1,4</sup>, Паневина А.В.<sup>1,4</sup>,  
Башмаков В.Ю.<sup>1,4</sup>, Михайлов А.А.<sup>2</sup>, Ащеулов А.Ю.<sup>4</sup>, Маслов  
А.Ю.<sup>1,3</sup>, Попов В.Н.<sup>1,4</sup>

*1 – ФГБОУ ВПО «Воронежский Государственный Университет»,  
Воронеж, Россия.*

*2 – БУЗ ВО «Воронежский областной клинический онкологический  
диспансер», Воронеж, Россия.*

*3 – Медицинский колледж имени Альберта Эйнштейна, Университет  
Йешива, Нью-Йорк, США.*

*4 – Автономная коммерческая организация «Научно-  
исследовательский институт постгеномных технологий», АНО  
«НИИПТ»*

Частота встречаемости рака почек с каждым годом возрастает в развитых странах. Самый высокий уровень наблюдается в Центральной Европе, и, в частности, в Чехии, достигнув 24,1 / 100,000 у мужчин и 10,5 / 100,000 женщин, в то время как эквивалентные показатели для Соединенного Королевства - 10,9 / 100,000 и 5,8 / 100000. Примерно 90% почечных раковых образований - карциномы почечных клеток развиваются в светлоклеточный почечноклеточный рак (ПКР), который является наиболее распространенным гистологическим типом рака (70-80%).

Целью данной работы являлась определение мутаций, характерных для рака почек пациентов Воронежского областного клинического онкологического диспансера методом таргеного секвенирования с гистологически подтвержденным ПКР.

Приготовление библиотек проводили с помощью набора



Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies, США) с панелями праймеров Comprehensive Cancer panel (Life Technologies, США), содержащей 16000 пар праймеров, покрывающих 15749 мутаций 409 онкогенов из базы данных COSMIC. Секвенирование проводили на базе платформы Ion PGM (Life Technologies, США). Анализ данных осуществляли посредством программы Ion Reporter, вид анализа - AmpliSeq CCP paired sample – сравнение обнаруженных однонуклеотидных замен в ткани с имеющимися в базах данных, отфильтровывание ложноположительных результатов с сохранением истинных мутаций. Первоначально полученные риды в ходе секвенирования отфильтровываются по ряду показателей – качеству (Phred quality scores >30) и выравниванию относительно референсного генома человека (версия hg 19 или grch 37). Далее возможные мутации отфильтровываются на основании аннотации генов для идентификации тех, которые локализованы в белок-кодирующих областях. Функциональные замены аннотируются с помощью баз данных CCDS, RefSeq, Ensembl и геномного браузера UCSC (University of California, Santa Cruz, [https:// genome.ucsc.edu/](https://genome.ucsc.edu/)). Визуальный просмотр финальных мутаций возможен в программе IGV (Broad Institute, Harvard University, <https://www.broadinstitute.org/igv/>).

Были выявлены в среднем по 30 соматических мутаций у каждого пациента в экзонных и интронных областях генов. Общими для всех пациентов были миссенс-мутации в экзонных участках генов VHL, KDR, CTC, APC и NRAS, в промоторных зонах генов EGFR, PDGFRA, HNF1A, HNF4A, HNF1B, TNF, в интронных областях генов CDKN2B, PTEN, NOTCH4, PAX5, участвующих в модификации хроматина. Ряд мутаций в указанных генах не содержится в имеющихся базах данных (COSMIC, dbSNP, ClinVar).

Выявлены мутации в гене супрессоре Гиппеля-Линдау VHL, которые наблюдаются в 80% случаев ПКР. Ряд мутаций, обнаруженных методом секвенирования, полученные в ходе

данного исследования, не зарегистрированные в существующих базах данных, говорят о популяционной гетерогенности причин развития ПКР, а так же о различиях в молекулярных механизмах протекания заболевания. Наблюдаемые изменения могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры развития светлоклеточного почечноклеточного рака.

Исследование поддержано грантом Министерства образования и науки РФ RFMEFI57414X0027 (номер соглашения 14.574.21.0027).

## ПРИНЦИПЫ ПОЛИМЕРОМИКИ В БИМЕДИЦИНСКОМ ПОСТГЕНОМНОМ МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНОМ АНАЛИЗЕ

Градов О.В.

*Институт Энергетических Проблем Химической Физики РАН,  
Россия*

*Institute of Mathematical Statistics, USA  
SIAM Activity Group on the Life Sciences, USA*

Развитие физического инструментария, предназначенного для определения последовательностей гетерополимеров, в частности – биополимеров, привело в начале XXI столетия к возможности полностью автоматизированного анализа и расшифровки последовательностей полимеров, в том числе – синтетических, в режиме реального времени. Методы масс-спектрометрического секвенирования пептидных и белковых структур, развивавшиеся с 1970-х гг. [1,2], как и методы масс-спектрометрического секвенирования нуклеиновых кислот, в том числе – с использованием стабильно-изотопных меток [3,4], развившиеся с начала 90-х гг., не являются узко-специализированными техниками, применимыми только к стандартным задачам молекулярной биологии в пределах стандартизированных протоколов протеомики, пептидомики и геномики. Возможно их использование в медицинской биомиметике, так как, пользуясь концептами QSPR (Quantitative Structure-Property Relationships) и напрямую выводимой из них номенклатурой QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships), можно использовать многие синтетические полимеры и композиты со свойствами биоподобия (biosimilarity) и биосовместимости (biocompatibility) в качестве «молекулярных протезов» для субституирования

тех или иных функций, выполняющихся их прототипами при их нахождении в живом организме. Существенную роль при этом может иметь замещение информационных, кодовых функций последовательностей, которые могут быть ответственны за возникновение молекулярных цитопатологий [5,6]. С позиций супрамолекулярной химии, комплементарные взаимодействия ведут к селективному распознаванию и координации рецептора и субстрата, а значит – их кодовому взаимодействию (даже если код состоит только из, как минимум, двух единиц, адекватных «приемнику» и «передатчику», хотя при координации в супрамолекулярной химии не всегда можно взаимно-однозначно опознать их, а функции ad hoc сопоставляются из размерам) не только в случае известных в молекулярной генетике взаимодействий, но и в огромном множестве процессов как внутриклеточной локализации, так и при взаимодействии клетки со средой. Поэтому необходимо обеспечение возможности «секвенирования» любого типа биополимеров и их миметиков, а в перспективе – получение биомедицинского пула BS\BS-данных (биоподобие и биосовместимость) на основе «сиквенсов» и расшифровки (декодирования) структур подобного рода.

В 2014 году в журнале «Analytica Chimica Acta» в издательстве «Elsevier» была опубликована программная статья немецких авторов, описывавшая масс-спектрометрический подход к секвенированию произвольных полимеров [7] и название для соответствующей отрасли работ – полимеромика (polymeromics – по аналогии с genomics, proteomics, peptidomics и т.д.). Эта статья, материалом для которой явились более ранние работы и диссертация одного из её авторов, защищенная в Йенском университете имени Фридриха Шиллера [8], породила, вследствие кажущейся исследованности полимеров (на аддитивном уровне это так, в то время как общих для всех полимеров методов установления сиквенсов, последовательностей не существовало), множество дискуссий. Так, известный специалист с 25-летним опытом работы в области полимеров и их реологии на «аддитивном» уровне Джон Спевачек (США, Миннесота), представляющий

как наиболее углубленный специалист в полимерной области характерный пример реакции на введение новых терминов и появление новых отраслей в последней, скептически оценивал полимеромику как неоправданное внедрение в физхимию тренда на «омиксный» подход, заимствованный из системной биологии [9]. Как заявлял Спевачек годом ранее [10], в случае появления полимерной «омики» на той же методологической основе должны быть введены также «термосетомика» (от «thermosetome»), «термопластикомика» (от «thermoplasticome», термопласт), «вискоэластикомика» (от «viscoelasticome», совокупность вязкоэластических и вязко-упругих свойств), «time-temperature superpositionome» (подмножество по критерию подобия температурно-временных кривых), «Mark-Houwink-Sakurada constantome» (по совокупности констант соответствующих уравнений, которые связывают характеристическую вязкость полимера в растворе и молекулярную массу этого полимера), а также «non-linear differential rotation modelome» (тоже от физической характеристики – «нелинейного дифференциального вращения») [10]. Однако здесь вполне очевидна ошибка или подмена понятий, так как все предложенные Дж. Спевачеком в качестве «научной иронии» термины никак не отвечают на вопрос о последовательности гетерополимера (как протеомика или геномика), то есть – о его информационном состоянии и, как следствие этого, – специфичности и кросс-совместимости (в частном случае – биосовместимости). Таким образом, критика «полимеромики» Дж. Спевачека является критикой его понимания «полимерома» как совокупности физических свойств, но не систем расположения последовательностей в гетерополимере.

Меж тем, ещё в 2013 году на II секции семинара «Немецкого полимерного института» (Dutch Polymer Institute) по синтезу и секвенированию наноструктур и фармакополимеров, проводившегося под эгидой Йенского центра по анализу частично упорядоченных сред (Jena Center for Soft Matter), был озвучен доклад «Polymeromics – sequencing synthetic polymers» [11], в котором упор был сделан на применимость полимеромики

к секвенированию фармакофоров и структур с потенциальным сродством или совместимостью к биологическим средам – как носителей фармакологических и иных биомедицинских агентов. Ранее разными авторами уже был продемонстрирован комплекс методов, имеющих отношение к получению данных о супрамолекулярной структуре и последовательности для многих молекулярно-биохимических задач; их видеопротоколы доступны всем подписчикам «Journal of Visualized Experiments» (JoVE) на странице аннотации программной статьи по полимеромике [7], находящейся по ссылке [12]. Кроме того, близость и «миметичность» техник стандартного de novo секвенирования, в том числе – новейших, эффективно работающих в режиме реального времени [13], и техник de novo секвенирования синтетических и абиогенных полимеров, представленных авторами процитированной работы [7] на 6-м Международном Симпозиуме по разделению и методам измерения характеристик натуральных и синтетических макромолекул (6th International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules) в Институте полимеров им. Лейбница (Leibniz-Institut für Polymerforschung) в Дрездене [14] не вызывает сомнений в рациональности предложенного ими подхода и в применимости его для медицинских задач, требующих биосовместимых полимерных материалов \ полимерных носителей. Следует отметить, что применимость данного подхода к синтетическим полимерам была продемонстрирована ранее в работах [15,16], являющихся до настоящего момента первичными источниками информации по методам масс-спектрометрического секвенирования искусственных полимеров в рамках полимеромного концепта, причем во второй работе [16] применялись в целом не свойственные нативным биологическим условиям методы синтеза \ полимеризации, такие как контролируемая радикальная полимеризация. Тем не менее, вследствие очевидной аналогии к биологическому секвенированию, это не помешало представлению концепта полимеромики как метода полимерного масс-спектрометрического секвенирования [7] на

библиографическом семинаре по биоинформатике («Currents in Bioinformatics») в Йенском Университете им. Фридриха Шиллера (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fakultät für Mathematik und Informatik) 05.11.2013 под модерированием (seminarleiter) Kerstin Scheubert [17]. Действительно, с точки зрения биоинформатики и дискретной математики химизм последовательностей не имеет значения или может быть инвариантен в пределах применимости метода его изучения, каковым в данном случае явилось полимеромное секвенирование [7,15,16].

Главным и необходимым инструментом получения сиквенса в технологиях полимеромики является масс-спектрометрия. На графических схемах принципа полимеромного анализа, приведенных в работах [15,16], указываются 3 способа ионизации ESI–электроспрей, APCI–химическая ионизация при атмосферном давлении, MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация; в качестве масс-спектрометрической техники указывается MS/MS – тандемная масс-спектрометрия, а решающей стадией является обработка сигнала и данных и data mining, которые в комплексе обозначены как «Evaluation by software». На выходе это обобщается подписью «POLYMER-OMICS», что говорит об уровне общедоступности последней для владельцев масс-спектрометрической техники, указанной в схеме (надо сказать, что в ЕС и США масс-спектрометры с такого рода системами ионизации являются рутинными приборами). Перечисленные в списке масс-спектрометрические техники являются классическими и для масс-спектрометрического секвенирования: электроспрей как для полипептидов, так и для полинуклеотидов [18-22], MALDI – как для «семантид», ДНК [23-34], так и для «эписемантид» полипептидной структуры [35-49] (формально пептидное и нуклеотидное секвенирование, с аппаратных позиций, для масс-спектрометра эквивалентны [50]), химическая ионизация также используется в ряде методов масс-спектрометрического секвенирования (как правило, пептидов) [51, 52]. В связи с этим, становится возможным распространение методов полимеромики и секвенирования синтетических /

абиогенных полимеров на широкое множество полимеров, для которых, в силу специфики их биологического использования и селективного взаимодействия с образ-распознающими биогенными системами, последовательность конкретного образца является существенной. Например, на практике, в иммунологии образ-распознающих рецепторов разнообразие форм / структур, с которыми имеет место супрамолекулярное взаимодействие [53-59], явственно указывает на очевидную небесполезность секвенирования не только рецепторов, но и многих субстратов (в терминах супрамолекулярной химии). В связи с тем, что супрамолекулярная химия лежит в основе действия рецепторов и субстратов в биомедицинской химии (в таких областях как: эндокринология, иммунология, нейрохимия, медицинская энзимология / ферментология и т.д.), можно считать, что полимеромика является универсальным подходом к многим областям применимости комплементарного постгеномного анализа в медицине.

## Литература

1. Paz M.A., Bernath A., Henson E., Blumenfeld O.O., Gallop P.M. Reductive desulfuration and mass spectrometric sequencing of sulfur-containing peptides // *Anal. Biochem.* – 1970. – Vol. 36, Issue 2. – P. 527-535.
2. Hudson G., Biemann K. Mass spectrometric sequencing of proteins. The structure of subunit I of monellin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1976. – Vol. 71, Issue 1. – P. 212-220.
3. Jacobson K.B., Arlinghaus H.F., Buchanan M.V., Chen C.H., Glish G.L., Hettich R.L., McLuckey S.A. Applications of mass spectrometry to DNA sequencing // *Genet. Anal. Tech. Appl.* – 1991. – Vol. 8. – P. 223-229.
4. Jacobson K.B., Arlinghaus H.F., Schmitt H.W., Sachleben R.A., Brown G.M., Thonnard N., Sloop F.V., Foote R.S., Larimer F.W., Woychik R.P., England M.W., Burchett K.L., Jacobson D.A. An approach to the use of stable isotopes for DNA sequencing // *Genomics.* – 1991. – Vol. 9, Issue 1. – P. 51-59.



- 5.Santos G.C. Standardizing preanalytical variables for molecular cytopathology // *Cancer Cytopathol.* – 2013. – Vol. 121, Issue 7. – P. 341-343.
- 6.Osamura R.Y. Molecular cytopathology: a new era of clinical cytology // *Acta Cytol.* – 2009. – Vol. 53, Issue 3. – 245-246.
- 7.Altuntaş E., Schubert U.S. “Polymeromics”: Mass spectrometry based strategies in polymer science toward complete sequencing approaches: a review // *Anal. Chim. Acta.* – 2014 – Vol. 808 – P. 56-69.
- 8.Altuntaş E. Polymeromics: structural elucidation of macromolecules via tandem mass spectrometry utilizing various ionization techniques / E. Altuntaş. – Jena : Friedrich-Schiller-Universität, 2013. – 233 p.
- 9.Spevacek J. Polymeromics? // *It’s the Rheo Thing* [St. Paul, Minnesota, USA]. – 2013. – Jul. 07 – URL: <http://www.rheothing.com/2013/07/polymeromics.html>
- 10.Spevacek J. The Omics of Polymers // *It’s the Rheo Thing* [St. Paul, Minnesota, USA]. – 2012. – Aug. 08 – URL page: <http://www.rheothing.com/2012/08/the-omics-of-polymers.html>
- 11.Böcker S. Polymeromics – sequencing synthetic polymers // *Proc. Second Dutch Polymer Institute (DPI) Workshop “Synthesis, formulation and sequencing of pharmapolymers and nanoparticle formulations”* (9 Dec. 2013; Jena, DPI). – Jena: Dutch Polymer Institute [DPI], Jena Center for Soft Matter [JCSM], 2013 – URL: [http://www.schubert-group.de/DPI\\_leafletHTE\\_workshop2\\_def.pdf](http://www.schubert-group.de/DPI_leafletHTE_workshop2_def.pdf).
- 12.Related JoVE Video [for PubMed Article]: “Polymeromics”: Mass spectrometry based strategies in polymer science toward complete sequencing approaches: A review // <http://www.jove.com/visualize/abstract/24370093/polymeromics-mass-spectrometry-based-strategies-polymer-science>
- 13.Ma B. Novor: Real-Time Peptide de Novo Sequencing Software // *Journal of The American Society for Mass Spectrometry.* – 2015. – Vol. 26 {Preprint; First online: 30 June 2015}. – P. 1-10. DOI: 10.1007/s13361-015-1204-0
- 14.Altuntas E., Schubert U. Polymeromics: Structural characterization of polymers towards de novo sequencing via tandem mass

spectrometry // Materials of the 6th International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules (6-8 February 2013; Dresden, IPF). – Dresden: Leibniz-Institut für Polymerforschung (Leibniz Institute of Polymer Research), – P. 14. (p. 117); URL: <https://www.yumpu.com/en/document/view/13470812/s-leibniz-institut-fur-polymerforschung-dresden-ev/117>.

15. Altuntaş E., Weber C., Kempe K., Schubert U.S. Comparison of ESI, APCI and MALDI for the (tandem) mass analysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline)s with various end-groups // European Polymer Journal. – 2013. – Vol. 49, Issue 8. – P. 2172–2185.

16. Altuntaş E., Krieg A., Baumgaertel A., Crecelius A.C., Schubert U.S. ESI, APCI, and MALDI tandem mass spectrometry of poly(methyl acrylate)s: A comparison study for the structural characterization of polymers synthesized via CRP techniques and the software application to analyze MS/MS data // Journal Of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry. – 2013. – Vol. 51, Issue 7. – P. 1595–1605.

17. «Currents in Bioinformatics» (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fakultät für Mathematik und Informatik) 05.11.2013 [Seminarleiter – K. Scheubert] // URL: <http://bio.informatik.uni-jena.de/lehre/winter-1314/currents-in-bioinformatics/>

18. Li G., Pei J., Yin Y., Huang G. Direct sequencing of a disulfide-linked peptide with electrospray ionization tandem mass spectrometry // Analyst. – 2015. – Vol. 140, Issue 8. – P. 2623-2627.

19. Wang X., Fu Y.F., Wang R.Y., Li L., Cao Y.H., Chen Y.Q., Zhao H.Z., Zhang Q.Q., Wu J.Q., Weng X.H., Cheng X.J., Zhu L.P. Identification of clinically relevant fungi and prototheca species by rRNA gene sequencing and multilocus PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, Issue 5. – e98110. [DOI: 10.1371/journal.pone.0098110].

20. Sharma V.K., Glick J., Liao Q., Shen C., Vouros P. GenoMass software: a tool based on electrospray ionization tandem mass spectrometry for characterization and sequencing of oligonucleotide adducts // Journ. Mass Spectrom. – 2012. – Vol. 47, Issue 4. – P. 490-501.

21. Quéméner B., Vigouroux J., Rathahao E., Tabet J.C., Dimitrijevic A., Lahaye M. Negative electrospray ionization mass spectrometry: a method for sequencing & determining linkage position in oligo-saccharides from branched hemicelluloses // *Journ. Mass Spectrom.* – 2015. – Vol. 50, Issue 1. – P. 247-264.
22. Ren D., Pipes G.D., Hambly D., Bondarenko P.V., Treuheit M.J., Gadgil H.S. Top-down N-terminal sequencing of Immunoglobulin subunits with electrospray ionization time of flight mass spectrometry // *Anal. Biochem.* – 2009. – Vol. 384, Issue 1. – P. 42-48.
23. Edwards J.R., Ruparel H., Ju J. Mass-spectrometry DNA sequencing // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 573, Iss. 1-2. – P. 3-12.
24. Fitzgerald M.C., Zhu L., Smith L.M. The analysis of mock DNA sequencing reactions using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rap. Comm. Mass Spectrom.* – 1993. – Vol. 7, Issue 10. – P. 895–897.
25. Roskey M.T., Juhasz P., Smirnov I.P., Takach E.J., Martin S.A., Haff L.A. DNA sequencing by delayed extraction-matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93, Issue 10. – P. 4724–4729.
26. Taranenko N.I., Allman S.L., Golovlev V.V., Taranenko N.V., Iso-la N.R., Chen C.H. Sequencing DNA using mass spectrometry for ladder detection // *Nucl. Ac. Res.* – 1998. – Vol. 26, Issue 10. – P. 2488–2490.
27. Kirpekar F., Norhoff E., Larsen L., Kristiansen K., Roepstorff P., Hillenkamp F. DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry // *Nucl. Ac. Res.* – 1998. – Vol. 26, Issue 11. – P. 2554–2559.
28. Monforte J., Becker C. High-throughput DNA analysis by time-of-flight mass spectrometry // *Nat. Med.* – 1997. – Vol. 3 - P. 360–362.
29. Fu D.J., Tang K., Braun A., Reuter D., Darnhofer-Demar B., Little D.P., O'Donnell M.J., Cantor C.R., Koster H. Sequencing exons 5 to 8 of the p53 gene by MALDI-TOF mass spectrometry // *Nat. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 16, Issue 4. – P. 381–384.
30. Shaler T.A., Tan Y., Wickham J.N., Wu K., Becker C.H. Analysis of enzymatic DNA sequencing reactions by matrix-assisted laser

desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rap. Com. Mass Spectrom.* – 1995. – Vol. 9, Issue 10. – 942-947.

31. Qiu C., Kumar S., Guo J., Yu L., Guo W., Shi S., Russo J.J., Ju J. Design and synthesis of cleavable biotinylated dideoxynucleotides for DNA sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Biochem.* – 2012. – Vol. 427, Issue 2. – P. 193-201.

32. Mao Y., Tan F., Yan S.G., Wu G.X., Qiao C.L., Zhang W.X., Cui F. High-throughput genotyping of single-nucleotide polymorphisms in *ace-1* gene of mosquitoes using MALDI-TOF mass spectrometry // *Ins. Sci.* – 2013. – Vol. 20, Issue 2. – P. 167-174.

33. Stepanov V.A., Trifonova E.A. Multiplex SNP genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry: Frequencies of 56 immune response gene SNPs in human populations // *Molecular Biology.* – 2013. – Vol. 47, Issue 6. – P. 852-862.

34. Chen W.T., Huang M.F., Chang H.T. Using surface-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry to detect SS- and DS-oligodeoxynucleotides // *Journ. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2013. – Vol. 24, Issue 6. – P. 877-883.

35. Boersema P.J., Taouatas N., Altelaar A.F., Gouw J.W., Ross P.L., Pappin D.J., Heck A.J., Mohammed S. Straightforward and de novo peptide sequencing by MALDI-MS/MS using a Lys-N metalloendopeptidase // *Mol. Cell Proteom.* – 2009. – Vol. 8. Issue 4. – P. 650-660.

36. Morgan J.W., Hettick J.M., Russell D.H. Peptide sequencing by MALDI 193-nm photodissociation TOF MS // *Meth. Enzymol.* – 2005. – Vol. 402. – P. 186-209.

37. Song J., Kim H.J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry peptide sequencing utilizing selective N-terminal bromoacetylation // *Anal. Biochem.* – 2012. – Vol. 423, Issue 2. – P. 269-276.

38. Noga MJ, Asperger A, Silberring J. N-terminal H3/D3-acetylation for improved high-throughput peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry with a time-of-flight / time-of-flight analyzer // *Rap. Comm. Mass Spectrom.* – 2006. –

Vol. 20, Issue 12. – P. 1823-1827.

39. Demine R., Walden P. Sequit: software for de novo peptide sequencing by matrix assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectrometry // *Rap. Comm. Mass Spectrom.* – 2004. – Vol. 18, Issue 8. – P. 907-913.

40. Zhang W., Krutchinsky A.N., Chait B.T. “De novo” peptide sequencing by MALDI-quadrupole-ion trap mass spectrometry: a preliminary study // *Journ. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2003. – Vol. 14, Issue 9. – P. 1012-1021.

41. Salih E. Synthesis of a radioactive thiol reagent, 1-S-[3H]carboxymethyl-dithiothreitol: identification of the phosphorylation sites by N-terminal peptide sequencing and matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Biochem.* – 2003. – Vol. 319, Issue 1. – P. 143-158.

42. Keough T., Youngquist R.S., Lacey M.P. Sulfonic acid derivatives for peptide sequencing by MALDI MS // *Anal. Chem.* – 2003 – Vol. 75, Issue 7. – P. 156A-165A.

43. Marekov L., Steinert P. Charge derivatization by 4-sulfophenyl isothiocyanate enhances peptide sequencing by post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Journ. Mass Spectrom.* – 2003. – Vol. 38, Issue 4. – P. 373-377.

44. Hettick J.M., McCurdy D.L., Barbacci D.C., Russell D.H. Optimization of sample preparation for peptide sequencing by MALDI-TOF photofragment mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 2001. – Vol. 73, Issue 22. – P. 5378-5386.

45. Nakagawa M., Yamagaki T., Nakanishi H. Fluorescent modification for peptide sequencing by postsource decay-matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Electrophoresis.* – 2000. – Vol. 21, Issue 9. – P. 1651-1652.

46. Keough T., Youngquist R.S., Lacey M.P. A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsource decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96, Issue 13. – P. 7131-7136.

47. Reiber D.C., Brown R.S., Weinberger S., Kenny J., Bailey J. Un-

known peptide sequencing using matrix-assisted laser desorption/ionization and in-source decay // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol. 70, Issue 6. – P. 1214-1222.

48. Mo W., Takao T., Shimonishi Y. Accurate peptide sequencing by post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rap. Comm. Mass Spectrom.* – 1997. – Vol. 11, Issue 17. – P. 1829-1834.

49. Cottrell J.S. Peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption ionization / time-of-flight mass spectrometry // *Biochem. Soc. Trans.* – 1995. – Vol. 23, Issue 4. – P. 914-917.

50. Owens D.R., Bothner B., Phung Q., Harris K., Siuzdak G. Aspects of oligonucleotide and peptide sequencing with MALDI and electrospray mass spectrometry // *Bioorg. Med. Chem.* – 1998. – Vol. 6, Issue 9. – P. 1547-1554.

51. Mudgett M., Bowen D.V., Kindt T.J. Peptide sequencing: the utility of chemical ionization mass spectrometry // *Biomed. Mass Spectrom.* – 1977. – Vol. 4, Issue 3. – P. 159-171.

52. Somuramasami J., Kenttämä H.I. Evaluation of a novel approach for peptide sequencing: laser-induced acoustic desorption combined with  $P(OCH_3)_2^+$  chemical ionization and collision-activated dissociation in a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer // *Journ. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2007. – Vol. 18, Issue 3. – P. 525-540.

53. Kumagai Y., Akira S. Identification & functions of pattern-recognition receptors // *Journ. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 125, Issue 5. – P. 985-992.

54. Zhang Q., Zmasek C.M., Godzik A. Domain architecture evolution of pattern-recognition receptors // *Immunogenetics.* – 2010. – Vol. 62, Issue 5. – P. 263-272.

55. Lata S., Raghava G.P. PRRDB: a comprehensive database of pattern-recognition receptors and their ligands // *BMC Genomics.* – 2008. – Vol. 9. – Art. 180.

56. Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20, Issue 1. – P. 10-16.

57. Dostert C., Meylan E., Tschopp J. Intracellular pattern-recognition

tion receptors // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60, Issue 7. – P. 830-840.

58. Altenbach D., Robatzek S. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics // *Mol. Plant. Micr. Interact.* – 2007. – Vol. 20, Issue 9. – P. 1031-1039.

59. Meylan E., Tschopp J., Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response // *Nature.* – 2006. – Vol. 442, Issue 7098. – P. 39-44.

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЯДЕРНОГО И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА И ТЕРАПИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЙ

Гуреев А.П. , Шафоростова Е.А., Попов В.Н.

*ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»*

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) – гетерогенная группа заболеваний, которые характеризуются постепенным угнетением анатомических и физиологических свойств нервной системы. Этиология большинства НДЗ не полностью понятна, но достоверно известно, что одной из причин являются нарушения в энергетическом метаболизме нейронов и окислительные повреждения [1]. Так как митохондрии являются центральным узлом, где сходятся все пути энергетического обмена, они являются крупным источником токсичных активных форм кислорода (АФК), и участвуют в регуляции процессов апоптоза или выживания клеток.

Подобные нарушения в функционировании митохондрий мозга так же отмечаются и при старении, что выражается, например, в снижении количества дыхательных субъединиц электронно-транспортной цепи митохондрий. Так как значительная их часть кодируется мтДНК, это может являться следствием снижения ее транскрипционной активности или же общим сокращением числа митохондрий. Но при этом с возрастом увеличивается скорость продукции АФК в нервной ткани, что является одним из ключевым факторов развития НДЗ. Это приводит к нарушениям нормального функционирования системы адаптивного биогенеза митохондрий, который опосредуется продукцией АФК. Таким образом, митохондрии мозга являются удобным фармакологическим таргетом для препаратов, оказывающих влияние не только на биоэнергетические характеристики митохондрий, но и на сигнальные пути, обеспечивающие



взаимодействие ядерного и митохондриального генома, что тесно связано с экспрессией как АФК-образующих, так и АФК-утилизирующих ферментов [2].

Метиленовый синий (МС) обладает более чем столетней историей лечения разнообразных патологий. В низких дозах МС не токсичен и легко преодолевает гематоэнцефалический барьер. В митохондриях МС может окисляться I и II комплексом ЭТЦ до лейкоформы (МСН<sub>2</sub>) и, восстанавливаясь, отдавать электроны на цитохром с. Таким образом, МС можно считать «мягким разобщителем», обеспечивающим альтернативный транспорт электронов. Неоднозначна роль МС, как антиоксиданта. Исследования на клеточных культурах показали, что МС способствует снижению продукции АФК [3]. В то время как исследования на изолированных препаратах митохондрий мозга морских свинок показали значительное увеличение скорости продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при добавлении 1 мкМ МС [4].

В нашем исследовании 15-месячные мыши получали МС с водой в концентрации 15 мг/кг в течение 60 дней. В ходе эксперимента не отмечалось изменений в массе тела и потреблении воды и пищи, но значительно (на 15%) увеличивалась общая скорость дыхания, что, вероятно, напрямую связано с семикратным увеличением экспрессии митохондриального гена COX1. Количественный ПЦР анализ выявил, что при употреблении МС в тканях мозга в 2,3 раза увеличивается количество копий мтДНК, но это скорее свидетельствует о возрастании транскрипционной и репликационной активности мтДНК, а не об увеличении общего количества митохондрий. Это следует из того, что измерение активности цитратсинтазы (хаускиппингового фермента митохондрий) в гомогенате (из расчета на массу ткани) не выявило достоверного увеличения активности. В тоже время в изолированных препаратах митохондрий (из расчета на концентрацию белка) активность цитратсинтазы увеличилась на 35%. Это косвенно свидетельствует об изменении протеома митохондрий при употреблении МС.

Исследование изолированных препаратов митохондрий мозга показало, что употребление МС привело к увеличению скорости продукции  $H_2O_2$  почти в 2 раза при дыхании через субстраты I комплекса (малат+глутамат) и на 54% при дыхании через II комплекс (сукцинат). Известно, что  $H_2O_2$  помимо того, что является АФК, может выполнять роль мессенджера, запуская реакции адаптивного биогенеза через Nrf/Are сигнальный каскад. Согласно данным Leslie [5],  $H_2O_2$  способен окислять PTEN, образуя дисульфидную связь между активным сайтом цистеина (C124) и другим цистеином (C71), тем самым обратимо инактивируя белок PTEN. PTEN является антагонистом PI3K. Поэтому в результате инактивации PTEN активируется PI3K-Akt сигнальный путь. Akt деактивирует гликогенсинтаза киназу-3 $\beta$ , позволяя тем самым nrf2 соединиться с Are на промоторной зоне NRF-1, запуская транскрипцию гена [6]. Количественный ПЦР анализ выявил трехкратное увеличение экспрессии NRF-1. В ядре NRF-1 способствует транскрипции ряда генов, в том числе и TFAM, который является ключевым фактором, обеспечивающим инициацию транскрипции мтДНК. У мышей, принимавших МС, экспрессия TFAM увеличилась в 5 раз.

Об МС-опосредуемой активации Nrf/Are каскада свидетельствует и пятикратное увеличение экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы SOD2. В то время как экспрессия цитоплазматической изоформы этого фермента (SOD1) осталось неизменной, так как она регулируется другими сигнальными системами. Увеличение экспрессии SOD2 способствует поддержанию высокого уровня  $H_2O_2$ , участвующего в активации митохондриального биогенеза, и в то же время не было выявлено увеличение экспрессии  $H_2O_2$ -утилизирующих ферментов (каталазы и пероксиредоксина-5).

Это исследование показывает перспективность использования химических соединений, действующих как «мягкие разобщители». С одной стороны они способны оказывать влияние на биоэнергетические параметры митохондрий, модулируя

энергический обмен. И в то же время могут воздействовать на различные сигнальные каскады, оказывая влияние на транскрипционную активность большого числа генов, играющих ключевую роль в этиологии не только широкого спектра нейродегенераций, но и в общих дегенеративных процессах, сопровождающих старение.

Работа выполнена при поддержке гранта 5346ГУ1/2014

### Список литературы

1. Lin M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases / M. Lin, M. Beal // *Nature*. – 2006. - Vol. 443, № 7113. – P. 787–795.
2. Wallace K.B. Mitochondrial targets of drug toxicity / K.B. Wallace, A.A. Starkov // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2000. – Vol. 40, №. 1. – P. 353-388.
3. Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. / E. Poteet [et al] // *PLoS ONE*. – 2012. - Vol. 7. – P. e48279
4. Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria / L. Tretter [et al] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – Vol. 77. – P. 317-330.
5. Redox regulation of PI 3kinase signalling via inactivation of PTEN / N.R. Leslie [et al] // *The EMBO journal*. – 2003. – Vol. 22, №. 20. – P. 5501-5510.
6. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation / K.M. Connor [et al] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, №. 17. – P. 16916-16924.

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК КАК ВОЗМОЖНЫЙ БИОМАРКЕР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РИСКА РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Епринцев А.Т., Селиванова Н.В.

*ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»*

**Аннотация.** Сахарный диабет (СД) — группа эндокринных заболеваний, развивающихся вследствие абсолютной или относительной недостаточности гормона инсулина. Одним из механизмов формирования данного заболевания является генетическая предрасположенность, в том числе обусловленная эпигенетическим статусом ДНК. Рассматривается метилирование промоторов различных генов как возможных биомаркеров для ранней диагностики данного заболевания. Показано, что изменение статуса метилирования гена *PGC1* указывает на специфическое метилирование генов митохондрий и коррелирует с уровнем инсулина у больных СД 2 типа.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, биомаркеры, диабет, эпигенетика

## DNA METHYLATION AS A POSSIBLE BIOMARKER FOR IDENTIFYING RISK OF DIABETES

A.T. Eprintsev, N.V. Selivanova

Voronezh State University

**Abstract.** Diabetes is a group of endocrine diseases, developing as a consequence of absolute or relative insufficiency of insulin. One of the mechanisms of formation of this disease is a genetic predisposi-

tion, including those caused by epigenetic status of DNA. Examines methylation of promoters of different genes as possible biomarkers for the early diagnosis of this disease. It is shown that the change of the methylation status of the gene PGCA1 points to the specific methylation of genes of mitochondria and correlates with the levels of insulin in patients with type 2 diabetes.

**Key words:** DNA methylation, biomarkers, diabetes, epigenetics

## ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) является хроническим заболеванием, обусловленным наследственной и/или приобретенной недостаточностью выработки инсулина в поджелудочной железе, в результате чего происходит повышение концентрации глюкозы в крови [1].

Эта сложная и разнообразная группа заболеваний характеризуется наличием гипергликемии, и в нынешнем столетии она достигла масштабов эпидемии [2]. Несмотря на активную работу в области исследований молекулярных показателей предрасположенности человека к определенным заболеваниям, еще очень многое остается неясным.

В настоящее время в мировой литературе накоплена база данных, указывающая на значительный вклад эпигенетических аномалий в инициацию и развитие многих неинфекционных заболеваний, особенно диабета, атеросклероза и различных видов рака [3, 4, 5]. Согласно результатам некоторых исследований, нарушения статуса метилирования возникают задолго до развития клинически выраженного заболевания [6]. Следовательно, изучение эпигенетического статуса генома является необходимым элементом для более полного понимания механизмов развития патологий и для выявления нового поколения биомаркеров с целью ранней диагностики диабета.

### **Потенциальные эпигенетические маркеры диабета**

Исследуя потенциальные эпигенетические маркеры СД 2 типа с

профилактическим или диагностическим характером, Идальго (Hidalgo) с соавторами обнаружили, что метилирование промотора гена ABCG1, участвующего в транспорте холестерина, коррелирует с базальным уровнем инсулина и расчетным индексом инсулинорезистентности HOMA-IR в Т-лимфоцитах [7]. Ян (Yuan W) с сотрудниками провели полногеномное исследование метилирования ДНК из крови близнецов, дискордантных по сахарному диабету, и выявили изменения в ДНК метилировании гена MALT1, участвующего в сигнальном пути ядерного фактора каппа В, а также гена GPR61. На основании полученных результатов показано, что статус метилирования промоторов данных генов может свидетельствовать о прогрессировании СД [8]. Кроме того, Белл (Bell C.G.) с соавторами установили связь между риском диабетической нефропатии в случаях СД 1 типа и метилированием 19 CpG-сайтов [9].

Недавно, Дик (Dick) с соавторами выявили связь между индексом массы тела и сайт-специфическим метилированием промотора гена HIF3A, кодирующего гипоксию-индуцируемый фактор 3а в крови и жировой ткани [10]. Показано, что специфическое метилирование исследуемого гена, выделенного из клеток крови, может свидетельствовать о метилировании ДНК в других тканях. Как один из возможных биомаркеров диабета, также изучался уровень метилирования промоторной области метаболического регулятора PPARC1A, кодирующего белок PGC1a, являющегося транскрипционным ко-активатором и регулирующим экспрессию многочисленных генов участвующих в функционировании митохондрий [11]. В настоящее время, метилирование промотора PPARC1A является лучшим примером корреляции сайт-специфического метилирования ДНК с изменениями секреции инсулина у больных СД 2 типа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования в области эпигенетики открывают новые возможности выявления биомаркеров риска и прогрессирования комплекса метаболических заболеваний, таких как СД. С

помощью анализа сайт-специфических ДНК-метилований, получена информация о корреляции метилирования ДНК с возрастом или образом жизни, связанными с факторами риска развития СД.

Таким образом, использование метилирования ДНК как молекулярного маркера для ранней диагностики сахарного диабета позволит выявить причины возникновения данного заболевания, определить пути его прогрессии, молекулярные мишени для терапии, а также провести мониторинг эффективности лечения.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sexton W.J. Effect of diabetes mellitus upon the male reproductive function / W.J. Sexton, J.P. Jarow // *J Urology*. – 1997. – Vol. 49. – P. 508-515.
2. Noor A. Antidiabetic activity of Aloe vera and histology of organs in alloxan induced diabetic rats / A. Noor [et al.] // *Current Sci*. – 2008. – Vol. 94. – P. 1070-1076.
3. Москалев Е. А. Методы определения картины метилирования геномной ДНК при канцерогенезе от отдельных нуклеотидов к метилуму / Е. А. Москалев, А. Т. Епринцев, J. D. Hoheisel // *Молекулярная биология*. – 2007. – Т. 41, № 5 – С. 793-807.
4. Gillberg L. et al. Does DNA methylation of PPARGC1A influence insulin action in first degree relatives of patients with type 2 diabetes? / L. Gillberg [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N. 3. – P. 1036-1046.
5. Назаренко М. С. Профиль метилирования ДНК в тканях сосудистого русла при атеросклерозе / М. С. Назаренко [и др.] // *Молекулярная биология*. – 2013. – Т. 47, № 3. – с. 398–404.
6. Euhus D.M. DNA methylation in benign breast epithelium in relation to age and breast cancer risk / D.M. Euhus [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. – 2008. – Vol. 17. – P. 1051–1059.
7. Hidalgo B. Epigenome-wide association study of fasting measures of glucose, insulin, and HOMA-IR in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study / B. Hidalgo [et al.] // *Diabetes*. – 2014.

– Vol. 63. – P. 801–807.

8.W.Yuan An integrated epigenomic analysis for type 2 diabetes susceptibility loci in monozygotic twins / W.Yuan [et al.] // Nat Commun. - 2014. - Vol. 5. - P.57-59.

9.Bell C.G. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus / C.G. Bell // BMC Med Genomics. – 2010. - Vol.3. – P.33- 37.

10.Dick K.J. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis / K.J. Dick [at al.] // Lancet. – 2014. – Vol. 383, №9933. – P. 1990–1998.

11.Ling C. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins / C.Ling [at al.] // J Clin Invest. – 2004. - Vol.114, №10. – P.1518–1526.



# АПОПТОТИЧЕСКАЯ ЭНДУНКЛЕАЗА EndoG ВЫЗЫВАЕТ СИНТЕЗ НЕАКТИВНОЙ ФОРМЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ И ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Жданов Д.Д., Соколов Н.Н., Фами Т., Баснакьян А.Г.

*ФГБНУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия. Институт медицинских наук Арканзаса, Литтл Рок, Арканзас, США*

Теломераза – ферментный комплекс, синтезирующий теломерные повторы на концах хромосом. Главным компонентом теломеразы является субъединица hTERT, обладающая отратно-транскриптазной активностью и синтезирующая теломерные повторы. Теломеразная активность (ТА) обнаружена в большинстве типов раковых клеток, что позволяет им поддерживать длину теломер на уровне достаточной для пролиферации. Регуляция активности hTERT осуществляется альтернативном сплайсингом (АС) её мРНК. Два АС варианта составляют большую часть общей мРНК hTERT. Делеция нуклеотидов в экзоне 6 (α- вариант) вызывает удаление части отратно-транскриптазного домена и приводит к потере каталитической активности. Делеция нуклеотидов экзонов 7 и 8 (β- вариант) вызывает сдвиг рамки считывания и появление стоп-кодона в экзоне 10. hTERT. Только полноразмерный вариант hTERT обладает каталитической активностью. Ранее было показано, что ТА зависит от интенсивности экспрессии некоторых апоптотических эндонуклеаз. Апоптотические эндонуклеазы – группа ферментов, разрушающих ДНК клеток на последних стадиях апоптоза. Эндонуклеаза G (EndoG) является сайт-специфичной эндонуклеазой способной избирательно расщеплять двойные цепи ДНК и РНК по поли-(dG) последовательностям. EndoG вызывает старение клеток и

значительно снижает их репликативный потенциал.

Для исследования влияния EndoG на AC hTERT была произведена трансфекция клеток карциномы молочной железы MCF-7 плазмидой pEndoG. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени показано, что сверхэкспрессия EndoG вызывает достоверное увеличение  $\alpha+\beta$ - AC варианта hTERT и уменьшение полноразмерной  $\alpha+\beta+$  формы. Увеличение белка  $\alpha+\beta$ - hTERT в трансфицированных EndoG клетках подтверждено вестерн-блоттингом. Увеличение экспрессии  $\alpha+\beta$ - варианта вызвало снижение TA в трансфицированных клетках, что подтверждено протоколом амплификации теломерных повторов. Опухолевые клетки, трансфицированные геном EndoG, через трое суток культивации переходили в состояние репликативного старения, (подтвержденное увеличением активности бета-галактозидазы) и на пятые сутки опухолевые клетки погибали по пути апоптоза. Известно, что при нормальных условиях EndoG локализуется в цитоплазме и митохондриях клетки и интернализуется в ядро только на последних стадиях апоптоза для деградации ДНК. Поэтому, было сделано предположение, что в нормальных условиях процесс AC пре-мРНК hTERT происходит не в ядре. Для проверки этого из опухолевых клеток MCF-7 были выделены ядра и цитоплазма. Анализ ОТ-ПЦР в реальном времени показал, что в ядрах полностью отсутствует  $\alpha+\beta$ - AC вариант hTERT при, приблизительно, равных количествах  $\alpha+\beta+$  вариантов. Инкубация ядер и цитоплазмы с рекомбинантной recEndoG вызывало появление  $\alpha+\beta$ - варианта в ядрах и достоверное его увеличение в цитоплазме. При этом происходило уменьшение  $\alpha+\beta+$  AC формы мРНК hTERT.

Мы предположили, что РНКазная активность EndoG производит олигонуклеотид, который вызывает делецию экзонов 7 и 8 пре-мРНК hTERT. Чтобы проверить это, тотальная РНК была выделена из ядер клеток MCF-7, переварена recEndoG, очищена от белков и инкубирована с ядрами MCF-7 клеток. Этот эксперимент показал, что РНК, переваренная recEndoG, способна вызывать  $\alpha+\beta$ - AC hTERT в ядрах данных клеток.

Было сделано предположение, что произведенный EndoG олигонуклеотид (EGPO – EndoG-produced oligonucleotide), способный индуцировать АС hTERT появляется из длинной не кодирующей РНК (long non-coding RNA, lncRNA), которая синтезируется с цепи ДНК, комплементарной гену hTERT. Для проверки этой гипотезы и установления длины EGPO, переваренная *gscEndoG* и очищенная РНК ядер MCF-7 клеток была проинкубирована 24-х членными ДНК-олигонуклеотидами, комплементарными участкам экзона 8 и интрона 8 потенциальной lncRNA hTERT и добавлена к ядрам клеток MCF-7. Данные олигонуклеотиды добразовывали не ковалентные комплексы с EGPO и блокировали его действие. ОТ-ПЦР анализ показал, что АС блокировался тремя олигонуклеотидами, что подтвердило правильность гипотезы и позволило определить размер EGPO на уровне 47 нуклеотидов.

Для подтверждения того, что EGPO сам по себе, а не следствия повышенного синтеза EndoG, способен активировать АС hTERT, ядра клеток MCF-7 были инкубированы с искусственно синтезированным EGPO. Данный эксперимент показал, что синтезированный EGPO способен активировать АС при концентрации  $10^{-7}$  М и выше. Наблюдалось повышение экспрессии  $\alpha+\beta$ - варианта и снижение полноразмерной  $\alpha+\beta+$  формы. Таким образом, EGPO вызывает АС hTERT.

Поскольку EGPO индуцирует АС hTERT в бесклеточной системе, то он должен активировать АС в клетках. Для проверки этого опухолевые клетки MCF-7 трансфецировали синтезированным EGPO. Экспрессия  $\alpha+\beta$ - АС варианта достоверно увеличивалась в клетках трансфецированных EGPO, что показано методом ОТ-ПЦР в реальном времени. При этом наблюдалось достоверное снижение  $\alpha+\beta+$  варианта. В трансфецированных EGPO клетках происходило значительное снижение ТА, что согласуется с данными о подавляющем действии АС вариантов hTERT на ТА. С целью идентификации lncRNA, из которой EndoG вырезает EGPO, производили ОТ тотальной РНК клеток с использованием

6-ти членного праймера случайной последовательности и последующей ПЦР с использованием праймеров, комплементарных различным участкам, предполагаемой LnRNA. Длина LnRNA составила 1754 основания. Нуклеотидная последовательность подтверждена сиквенированием. Данная молекула перекрывает окончание интрона 6, полностью экзоны 7 и 8 и интрон 7, а также начало интрона 8 цепи мРНК hTERT. В целом, в работе описан новый механизм АС, являющийся результатом РНКазной активности EndoG. Данный механизм можно описать по следующей гипотетической схеме (Рис. 1А). С кодирующей цепи гена hTERT синтезируется пре-мРНК, а с матричной (не кодирующей) цепи синтезируется LnRNA размером 1754 нуклеотида. EndoG вырезает из LnRNA 47-членный РНК-олигонуклеотид EGPO, комплементарный пре-мРНК hTERT в месте соединения экзона 8 и интрона 8 (Рис. 1Б). Взаимодействие EGPO и пре-мРНК hTERT вызывает АС и появление  $\beta$ - варианта. Очевидно, что данный механизм требует более глубокого изучения. Но очевидно, что он существенно отличается от всех известных ранее механизмов, поскольку участие EndoG в процессе АС и образование малых не кодирующих РНК описано впервые.

Данная работа является фундаментальным исследованием, однако, описанный механизм может служить теоретической основой для разработки методов терапии заболеваний, в этиологии которых лежат процессы клеточной пролиферации, в том числе онкологических и аутоиммунных заболеваний.

**ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН  
В КОНСЕРВАТИВНОМ M2E-ЭПИТОПЕ  
ВИРУСА ГРИППА А, РАСПОЛОЖЕННОМ НА  
ПОВЕРХНОСТИ ХИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ВTM,  
НА ИНФЕКЦИЮ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ  
В РАСТЕНИЯХ И ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ  
КАНДИДАТНЫХ НАНОВАКЦИН**

**Петухова Н.В., Гасанова Т.В., Курчашова С.Ю., Иванов П.А.**

*ФГБОУ ВПО «Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова», Биологический факультет, кафедра вирусологии; ФГБОУ ВПО «Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова», НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского*

Ранее в нашей лаборатории были получены и частично охарактеризованы химерные частицы на основе генома вируса табачной мозаики (ВТМ), несущие перспективные для защитного иммунного ответа консервативные эпитопы вируса гриппа А, в том числе консенсусную последовательность внеклеточного домена M2e матриксного белка M2 вируса гриппа А. Ген белка оболочки (БО) ВТМ был слит с целевой последовательностью, а остатки цистеина в положениях 17 и 19 (вектор ВТМ-M2e-cys) были заменены на остатки серина (ВТМ-M2e-ser) или аланина (ВТМ-M2e-ala) [1,2].

Выявлена существенная разница в развитии инфекции, вызванной тремя вирусными векторами ВТМ-M2e. Рекомбинантные вирусы сохраняли способность к дальнему транспорту по сосудистой системе растений, вызывая системную инфекцию *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glauca* и *Nicotiana glauca*. По сравнению с вирусом дикого типа,

отличительными симптомами инфекции в случае ВТМ-М2е-ser являлись желтые системные хлорозы листьев, что демонстрирует влияние слитого с БО М2е-пептида на взаимодействие вируса с хозяином. Наличие остатков аланина в соответствующих позициях М2е-эпитопа приводило к значительно более мягким симптомам инфекции. В частности, растения *N. benthamiana* и *N. sylvestris*, инфицированные обоими рекомбинантными вирусами, заметно отличались по высоте (через 10-15 дней после инокуляции растения, зараженные ВТМ-М2е-ser, останавливались в своем развитии, а при инфекции ВТМ-М2е-ala растения продолжали рост). Если принять во внимание существенную разницу в уровнях накопления ВТМ-М2е-ser (1 г/кг) и ВТМ-М2е-ala (4 г/кг) в системных листьях, можно предположить, что данный эффект может быть обусловлен процессами, происходящими на стадии выхода вируса из флоремы в клетки мезофилла и внутриклеточной локализации вируса.

Соотношение антител (АТ) к эпитопу и носителю (БО) в сыворотках мышей после инъекции препаратов химерных частиц, выделенных из системных листьев, варьировало от 2.7/1 (ser) до 5/1 (ala). Иммуноферментным анализом было показано, что АТ взаимодействовали с белком М2 на поверхности клеток, зараженных вирусом гриппа. Профили иммуноглобулинов IgG1/IgG2a составляли 0.7/1 (ser) и 3.2/1 (ala). Мыши, вакцинированные ВТМ-М2е-ala/ser, были устойчивы к заражению 5 летальных доз (LD50) гомологичного вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), при этом ВТМ-М2е-ala обеспечивал высокую степень защиты от 5 LD50 гетерологичного вируса А/California/04/09 (H1N1) (4 аминокислотные замены в последовательности М2е без учета мутаций цистеинов, уровень выживаемости 70%).

С помощью методов электронной микроскопии было изучено влияние единичных мутаций на внутриклеточную локализацию химерных частиц в неинокулированных верхних листьях *N. benthamiana*. В клетках мезофилла, зараженных мутантами ВТМ-М2е-ser и ВТМ-М2е-cys, наблюдали большое количество

вирусных частиц, которые были представлены значительными скоплениями в цитоплазме, а также рассеяны в центральной вакуоли. Диаметр вирионов Cys в вакуоли превышал диаметр частиц Ser. Инфицированные клетки содержали трубчатые включения, описанные ранее для ВТМ дикого типа.

Инфекция вектора ВТМ-M2e-ala также приводила к накоплению вируса в клетках мезофилла. Однако, в отличие от заражения Ser-мутантом, в случае ВТМ-M2e-ala наблюдали одиночно лежащие частицы вируса и скопления вирионов преимущественно в цитоплазме. Химерные частицы в центральной вакуоли практически не обнаруживались. Таким образом, прослеживается корреляция между быстрой гибелью растения в случае заражения вирусом ВТМ-M2e-ser (2-3 недели после инокуляции) и более выраженными нарушениями ультраструктуры клеток мезофилла по сравнению с ВТМ-M2e-ala.

Данная работа была частично поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

#### Литература:

1. Petukhova N.V. Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by Tobacco mosaic virus-based vectors / N.V. Petukhova, T.V. Gasanova, L.A. Stepanova, O.A. Rusova, M.V. Potapchuk, A.V. Korotkov, E.V. Skurat, L.M. Tsybalova, O.I. Kiselev, P.A. Ivanov, J.G. Atabekov // *Curr. Pharm. Des.* - 2013. - V. 19. - P. 5587-5600.
2. Petukhova N.V. High-level systemic expression of conserved influenza epitope in plants on the surface of rod-shaped chimeric particles / N.V. Petukhova, T.V. Gasanova, P.A. Ivanov, J.G. Atabekov // *Viruses.* - 2014. - V. 6. - P. 1789-1800.

# **AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN CONSERVED INFLUENZA M2E EPITOPE ON THE SURFACE OF CHIMERIC TMV PARTICLES AFFECT THE DEVELOPMENT OF INFECTIONS OF VIRAL VECTORS IN PLANTS AND PROTECTION BY CANDIDATE NANOVAACCINES**

**N.V. Petukhova, T.V. Gasanova, S.Y. Kurchashova, P.A. Ivanov**

Lomonosov Moscow State University, Department of Virology;  
Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology

Characterization of vectors based on the Tobacco mosaic virus genome carrying conserved influenza M2e epitope on their surface demonstrated that point substitutions in foreign antigen greatly affect the systemic symptoms and accumulation of chimeric particles in different plant hosts. Mice vaccinated by purified recombinant viruses were resistant to lethal challenge with either homologous or heterologous influenza strains, but the features of immune response were significantly dependent on those substitutions as well. Analysis of intracellular localization of chimeric particles by electron microscopy showed that shape of the particles and violations of ultrastructure of infected cells are different between TMV-M2e mutants and correlate to development of plant infections.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова Lomonosov Moscow State University  
Иванов Петр Алексеевич, ведущий научный сотрудник кафедры вирусологии  
pivanov@genebee.msu.ru  
Тел.: (910)4202775  
Ivanov Peter A., Leading Researcher of the Department of Virology  
pivanov@genebee.msu.ru  
Tel.: (910)4202775



## МЕТАСТАТИЧЕСКОЕ ПОРАЖЕНИЕ ПЕЧЕНИ - МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Каганов О.И. , Козлов С.В., Ткачев М.В., Швец Д.С., Козлов  
А.М.

*ГБОУ ВПО Самарский государственный медицинский университет*

**Аннотация.** Одним из решений проблемы лечения больных метастатическим колоректальным раком является оценка активности опухолевой ткани в метастатических очагах в процессе лечения, в сочетании с инструментальными методами. В этой связи особый интерес вызывают молекулярно-биологические маркеры колоректального рака, которые способны осуществлять, так называемую, «функциональную» визуализацию опухолей.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, метастазы, молекулярно-биологические маркеры.

## LIVER METASTASES - METHODS OF DIAGNOS- TICS

O.I. Kaganov, S.V. Kozlov, M.V. Tkachev, D.S. Shvets, A.M.  
Kozlov

Samara State Medical University

**Abstract.** One solution to the problem of treating patients with metastatic colorectal cancer, is to evaluate the activity in the tumor tissue of metastatic foci in the treatment process, in conjunction with instrumental methods. In this regard, of particular interest are molecular-biological markers for colorectal cancer, which are able to carry out the so-called “functional” imaging of tumors.

**Keywords:** colorectal cancer, metastases, molecular biological

markers.

Актуальность. В экономически развитых странах мира колоректальный рак (КРР) по темпам роста занимает ведущие позиции [1]. По данным American Cancer Society (2011) максимальные показатели заболеваемости отмечены в Северной Америке, Западной и Северной Европе, относительно высокие значения зафиксированы в Южной и Восточной Европе, умеренные в Южной Америке, а низкие в странах Африки и Азии, за исключением Японии [2]. По данным отечественных авторов, на сегодняшний день интенсивно разрабатываются и внедряются в клиническую практику инструментальные, молекулярно-биологические и иммуногистохимические методы исследования [3]. Эти методы характеризуют степень агрессивности опухолевого процесса и, кроме того, позволяют персонализировать прогноз клинического течения и чувствительность опухоли к проводимой терапии у больных КРР с метастазами в печени [4]. Клетки злокачественных новообразований в процессе своей жизнедеятельности продуцируют особые вещества, которые попадают в жидкие среды организма в повышенном количестве [5]. В нормальных клетках эти вещества либо отсутствуют, либо присутствуют в очень малых количествах [6]. Такие вещества, связанные с опухолями (опухолевые маркёры), могут быть определены иммунологическими методами с использованием специфических антител, направленных против иммуногенных участков соответствующих опухолевых маркёров [7]. В комплексе с другими методами, исследование их концентрации используют для выявления опухоли в организме и для контроля эффективности лечения [8].

Цель. Изучение зависимости показателей онкомаркёров (ОМ) от степени распространенности метастатического поражения печени при колоректальном раке.

Материалы и методы. В программу исследования вошли 60 больных с диагнозом колоректальный рак. Прогрессия процесса в виде метастатического поражения печени в данной группе

больных была выявлена в среднем через  $15,18 \pm 6,09$  месяцев после удаления опухоли толстой кишки. Всем пациентам в сыворотке крови определяли концентрацию РЭА, СА19-9, СА242 методом иммунохемилюминесцентного анализа с использованием анализатора Immulite 2000 (DPC, США).

Результаты. В группе больных, у которых было выявлено до 3 метастазов (mts) в печени, показатели РЭА составили  $69,37 \pm 59,49$  нг/мл, СА19-9  $142,21 \pm 105,21$  Е/мл, СА242  $142,53 \pm 105,19$  Е/мл, в группе пациентов имевших 4-5 mts значения ОМ были выше: РЭА  $88,89 \pm 78,30$  нг/мл, СА19-9  $163,71 \pm 73,37$  Е/мл, СА242  $180,87 \pm 104,70$  Е/мл ( $p=0,05$ ,  $p=0,12$ ,  $p=0,05$  соответственно). В группе больных с суммой максимальных размеров выявленных mts до 7 см показатель РЭА составил  $57,08 \pm 39,12$  нг/мл, СА19-9  $115,29 \pm 96,64$  Е/мл, СА242  $126,46 \pm 83,47$  Е/мл, а в группе пациентов с суммой максимальных размеров выявленных mts более 7 см показатели ОМ были значимо выше: РЭА  $99,43 \pm 81,45$  нг/мл, СА19-9  $176,65 \pm 75,03$ , СА242  $191,45 \pm 111,81$  Е/мл ( $p=0,03$ ,  $p=0,01$ ,  $p=0,01$  соответственно).

Заключение. Проведенные исследования показали, что у больных с наличием до 3 колоректальных mts в печени и с суммой максимальных размеров до 7 см средние показатели РЭА, СА19-9, СА242 были значимо ниже, чем у больных, имевших более 3 mts, с суммой максимальных размеров более 7 см.

#### Список литературы:

1. Козлов С.В., Каганов О.И., Кутырева Ю.Г., Торопова Н.Е., Ткачев М.В., Козлов А.М., Швец Д.С. Применение онкомаркеров при мониторинге результатов лечения больных с метастазами колоректального рака // Медицина критических состояний. 2014. № 2. С. 26-29.
2. М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Прогностический критерий колоректального рака [Текст] // VI ежегодная Международная

- научная Интернет - конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX
- 3.Ткачев М.В. Мониторинг результатов радиочастотной термоабляции колоректальных метастазов печени с применением онкомаркеров // Аспирантский вестник Поволжья. 2014. № 5-6. С. 112-115.
- 4.Козлов С.В., Каганов О.И., Морятов А.А., Козлов А.М., Ткачев М.В., Швец Д.С. Место радиочастотной термоабляции в комбинированном лечении больных с билобарными метастазами в печени // Поволжский онкологический вестник. 2014. № 1. С. 31-39.
- 5.М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Прогностические факторы при колоректальном раке [Текст] // VI ежегодная Международная научная Интернет - конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX
- 6.Пат. 2523138 РФ. Способ прогнозирования риска развития прогрессии заболевания после выполнения радиочастотной термоабляции метастазов колоректального рака в печень / Каганов О.И., Козлов С.В., Швец Д.С., Ткачев М.В., Каганова М.А. Оpub. 07.03.2013
- 7.Козлов С.В., Каганов О.И., Ткачев М.В., Козлов А.М., Швец Д.С. Метод радиочастотной термоабляции в лечении больных с множественными билобарными метастазами колоректального рака в печени // Российский онкологический журнал. 2014. Т. 19. № 4. С. 27-28.
- 8.М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Методы профилактики постабляционного синдрома [Текст] // VI ежегодная Международная научная Интернет -конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX

## МОНИТОРИНГА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ОНКОМАРКЕРОВ

Каганов О.И. , Козлов С.В., Ткачев М.В., Швец Д.С., Козлов  
А.М.

*ГБОУ ВПО Самарский государственный медицинский университет*

**Аннотация.** Применение математической модели на этапе мониторинга больных колоректальным раком дает возможность выбрать наиболее эффективный алгоритм обследования больных после выполнения малоинвазивного лечения, что позволяет своевременно выявлять дальнейшую прогрессию заболевания.

**Ключевые слова:** математическая модель, колоректальный рак, алгоритм.

## MONITORING COLORECTAL CANCER USING ONKOMARKERY

O.I. Kaganov, S.V. Kozlov, M.V. Tkachev, D.S. Shvets, A.M.  
Kozlov

Samara State Medical University

**Abstract.** The use of mathematical models on the stage of monitoring colorectal cancer patients gives the opportunity to select the most effective algorithm of examination of patients after minimally invasive treatment that allows timely identification of further progression of the disease.

**Keywords:** the mathematical model, colorectal cancer, algorithm.

**Актуальность.** Ранняя диагностика прогрессии заболевания после РЧА метастазов колоректального рака (КРР) дает возможность

изменения схемы лечения, что может продлить жизнь больного [1]. Наиболее часто мониторинг пациентов с метастазами КРР в печени после радиочастотная термоабляция (РЧА) проводится с использованием ультразвуковое исследование брюшной полости (УЗИ), компьютерная томография брюшной полости (КТ) и магнитно-резонансная томография брюшной полости (МРТ) [2]. При этом, каждый метод лучевой диагностики, дополняя друг друга, направлен на решение специфических задач [3]. Однако, несмотря на диагностические успехи, сохраняются сложности интерпретации данных после РЧА метастазов КРР в печени в случаях после проведенной химиотерапии или прогрессии заболевания [4]. Мониторинг больных после РЧА метастазов КРР в печени сопряжен со следующими трудностями: высокой стоимостью скринингового проведения КТ и МРТ, отсутствием высокоспецифичных признаков при выполнении УЗИ печени [5]. Учитывая отсутствие 100% точности в проведении мониторинга у больных после РЧА, а так же высокую трудоемкость и стоимость, врачи продолжают поиск новых способов оптимизации [6]. Кроме того данные методы не позволяют оценить опухолевую активность ткани в метастазах до и после РЧА у больных КРР [7]. Таким образом, применение современных технологии при персонализированном мониторинге онкологических больных наиболее актуально [8].

Цель работы. Прогнозирование на дооперационном этапе риска развития прогрессии заболевания после выполнения радиочастотной термоабляции) метастазов колоректального рака в печени.

Материалы и методы. Проведено исследование результатов комбинированного лечения с применением чрескожной радиочастотной термоабляции (РЧА) у 93 больных с единичными и множественными билобарными метастазами колоректального рака (КРР) в печени, выявленными в различные сроки диспансерного наблюдения после удаления первичной опухоли. Проводился многофакторный анализ, изучающий влияние различных предикторов на риск развития рецидива и появления новых метастазов после проведения РЧА.

Результаты исследования. На основании проведенного исследования была создана математическая модель  $P=1/1+2,71-z$ , где  $p$  - вероятность того, что произойдет интересующее событие;  $2,71$  – основание натуральных логарифмов;  $z$  – формула множественной линейной регрессии:  $Z= 4,68*X1+0,02*X2+0,03*X3-4,68*X4-12,03$ , В настоящем исследовании математическую модель строили в модуле логистической регрессии по алгоритму Вальда, с пошаговым исключением в программе SPSS. При использовании этого метода первоначально брались в расчет все 11 предикторов, после чего они ранжировались и пошагово исключались в соответствии с их вкладом в модель. В результате была получена модель, включающая в себя 4 наиболее значимых предиктора ( $X1-X4$ ):  $X1$ -число выявленных метастазов;  $X2$ -значение СЕА до операции в нг/мл;  $X3$ - значение СА19-9 до операции в Ед/мл;  $X4$  - число метастазов размером от 2 до 3 см. Далее приведена классификационная таблица, рассчитанная на основании вышеуказанной модели. Проведено сравнение результатов у 93 больных, полученных при выполнении КТ брюшной полости с целью выявления рецидива и прогрессии метастатического процесса (наблюдаемые результаты) и предсказанных результатов, полученных при помощи математической модели. Была просчитана чувствительность 95,5%, специфичность 100% и точность 96,8% данной математической модели.

Выводы. Применение математической модели позволяет выбрать наиболее эффективный алгоритм обследования больных после выполнения малоинвазивного лечения, что позволяет своевременно выявлять дальнейшую прогрессию заболевания.

Список литературы:

1. М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Онкомаркеры - выбор при колоректальном раке// VI ежегодная Международная научная Интернет - конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX
2. Воздвиженский М.О., Дудко С.М., Стадлер В.В., Швец Д.С., Ткачев М.В. Лечение пациента с нейрогенной опухолью забрюшинного пространства с инвазией в нижнюю полую вену // Хирургия. Журнал

им. Н.И. Пирогова. 2013. № 6. С. 69-71.

3.М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Применение аблативных методов в лечении онкологических больных // VI ежегодная Международная научная Интернет - конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX

4.Козлов С.В., Каганов О.И., Ткачев М.В., Козлов А.М., Швец Д.С. Прогнозирование риска развития прогрессии заболевания после радиочастотной термоабляции метастазов колоректального рака в печени // Международный научно-исследовательский журнал. 2014. № 3-4 (22). С. 114-115.

5.М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Паллиативные операции в онкологии // VI ежегодная Международная научная Интернет – конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX

6.Козлов С.В., Каганов О.И., Ткачев М.В., Козлов А.М., Швец Д.С. Радиочастотная термоабляция при комбинированном лечении больных с билобарными метастазами колоректального рака в печени // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2014. Т. 2. № 3. С. 11-17.

7.Ткачев. М.В. Математическая модель расчета риска развития прогрессии заболеваия после радиочастотной термоабляции метастазов колоректального рака в печени // Аспирантский вестник Поволжья. 2015. №1-2. С138-143

8.М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Абляция, применяемая в онкологии // VI ежегодная Международная научная Интернет – конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015XX-XX



# ОСОБЕННОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОГО ПРОТЕОМА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Котенева Е.А., Печковский Г.А., Котенев Е.С., Аксенова Л.Ю.,  
Гнусарева О.А.

*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, Ставрополь,  
Россия*

Возбудители особо опасных инфекций (ООИ) до сих пор представляют серьезную опасность для мирового сообщества. Это связано с существенным увеличением миграционных и туристических потоков, их быстрому изменению в связи с меняющейся геополитической обстановкой, что может стать причиной эпидемических осложнений, а так же с постоянной угрозой использования патогенных микроорганизмов в качестве поражающих агентов при актах биотерроризма. Всестороннее изучение возбудителей ООИ является необходимым условием разработки лекарственных и диагностических препаратов нового поколения. Детальное изучение особенностей белкового состава клеток микроорганизмов относящихся к I-II группам патогенности (*Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*) и функционирования белковых комплексов, определяющих вирулентность и иммуногенность, позволяет определить основные направления разработки новых средств патогенетической и антибактериальной терапии, подходы к созданию новых вакцин.

Цель работы: подбор оптимальных параметров экстракции тотального протеома возбудителей ООИ, которые позволят эффективно экстрагировать максимальное количество клеточных белков исследуемых микроорганизмов и будут соответствовать требованиям СП 1.3.3119-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»

Материалы и методы: в работе были использованы вакцинные и авирулентные штаммы: *Y.pestis* EV; *F.tularensis* НИИЭГ 15, 15/10; *B.anthraxis* СТИ, Sterne 34F2, 71/12, 228/4. Все штаммы выращивали в течении 24 ч. при 370 С на твердой питательной среде, в зависимости от вида возбудителя. Для экстракции тотального протеома использовали лизирующие буферы с разной концентрацией хоатропных агентов (мочевины и тиомочевины) и неионных детергентов. Непосредственно перед работой в готовый буфер добавляли коктейль ингибиторов бактериальных протеаз (Sigma) до конечной концентрации 1 мкг/мл. Так же в работе использовали коммерческий набор MicroRotor for Lysis-Kit (Bio-Rad) в соответствии с инструкцией производителя. Все работы проводили в соответствии с требованиями СП 1.3.3119-13 в боксе биологической безопасности 3 класса. Пробоподготовку проводили следующим образом: культуру микроорганизма стерильной пластиковой петлей суспендировали в лизирующем буфере под оптический стандарт мутности 1 ООЕ и инкубировали при температуре 370С в течении часа. Далее образцы переносили в микроцентрифужные пробирки с PVDF фильтром с диаметром пор 0,22 мкм и центрифугировали в центрифуге с аэрозольным фильтром в ББ 3 класса в течении 20 мин. При 12 000 об/мин. Фильтрат высевали в объеме 0,1 мл на соответствующую данному виду питательную среду и инкубировали при 370 С с ежедневным просмотром посевов в течении 5 суток для *Y.pestis* и *B.anthraxis* и 10 суток для *F.tularensis*. Стерильные экстракты делили на аликвоты и хранили при -800 С. Двумерный электрофорез проводили с использованием комплекта оборудования для протеомных исследований производства фирмы “Bio-Rad” и специализированного программного обеспечения “Quantity One 1-D analysis software” и “PDQuest 2-D analysis software”. Концентрацию образцов перед проведением 1-го направления (ИЭФ) измеряли на флуориметре Qubit и параллельно методом Бредфорда. Изоэлектрофокусировку проводили с использованием стрипов ReadyStrip IPG strips pH 3-10, 7 см, загружая образцы из расчета 10-15 мкг белка на 300 мкл регидратационного буфера. Уравновешивание стрипов проводили в тяжелом буфере с 6М

мочевинной в два этапа: с 2% DDT и 2,5 % йодацетамидом по 15 мин. Второе направление проводили в камере Mini Protean с охлаждением 10 С в 12% ПААГ в течении ~1 час 30мин. Готовые гели окрашивали серебром и кумасси G250.

Результаты: При анализе гелей белковых экстрактов образцов штаммов *Y.pestis* и *F.tularensis* на геле визуализировалось около 90 белковых пятен разной интенсивности, большинство из которых приходились на диапазон значений рН 5-8. Для образцов сибирезвенного микроба наблюдалось небольшое количество визуально видимых белковых пятен (менее 30), располагавшихся в диапазоне значений рН 4-6. Низкая эффективность экстракции тотального протеома *B. anthracis* по всей видимости, обусловлена особенностями строения клеточной стенки данного возбудителя, которая, по сообщениям многих исследователей, слабо поддается воздействию физических и химических методов экстракции. Таким образом, нами разработаны и апробированы на практике методы экстракции тотального протеома неспорообразующих возбудителей ООИ – чумы и туляремии, сочетающие эффективную белковую экстракцию и соблюдение требований СП 1.3.3119-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Для возбудителя сибирской язвы в дальнейшем будут опробованы методики, сочетающие физические и химические методы дезинтеграции.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ЗВЕНЬЕВ ПАТОГЕНЕЗА ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ 500 ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАБОТОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ NANOS- TRING TECHNOLOGIES

Лунькова А. А.<sup>1</sup>, Тагирова М.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup>Московский Научно-Практический Центр

Хроническая крапивница (ХК) представляет собой заболевание наружных покровов (кожи), характеризующееся возникновением очагов сыпи в виде волдырей различного размера; обычно сопровождается зудом и жжением пораженных участков. Чаще всего пусковым сигналом биохимического каскада, генерирующего ХК, является реакция иммунокомпетентных клеток на аллергены. Патофизиологические механизмы развития ХК не изучены. Считается, как и при бронхиальной астме, в развитии ХК большую роль играет генетическая предрасположенность и воздействие факторов внешней среды. Масштабные коллаборативные исследования по выявлению ассоциации с ХК выявили гены-кандидаты в развитии ХК: генные сети клеточной активации и гистамина (гены FcεRI, HNMT, HRH1, HRH2, TNF-α, TGFβ1, ADORA3, IL-10), генная сеть арахидоновой кислоты (гены ALOX5, CysLTR1, LTC4S, PTGER4) и тд. (Losol et al., 2014).

Изучение состояния иммунной системы у больных с ХК остается актуальным для понимания отдельных звеньев патогенеза, контроля лечения и прогнозирования течения заболевания.

В данной работе был проведен анализ экспрессии 500 генов

в периферической крови у больных детей с хронической крапивницей и контрольной группы. Анализируемые гены были связаны с работой иммунной системы, определены с помощью метода Nanostring Technologies®, который позволяет напрямую детектировать молекулы РНК и проводить их количественный анализ. Оригинальные экспериментальные данные экспрессии 500 генов были нормализованы с помощью профиля экспрессии 15 референсных генов (ABCF1, ALAS1, EEF1G, G6PD, GAPDH, GUSB, HPRT1, OAZ1, POLR1B, POLR2A, PPIA, SDHA, TBP, TUBB, RPL19) и статистически обработаны с использованием программы nSolver Nanostring. На основе анализа была построена «тепловая» карта профиля экспрессии генов по двум группам исследуемых индивидуумов (хроническая крапивница; контроль), что позволило выявить гены в биоинформатических базах данных, такие как NCBI gene, GeneMania, ассоциированные с ХК. Значительная статистическая повышенная экспрессия была характерна для 24 гена (гены BCL10, CD22, CD97, гены класса HLA тип 1 и тд. ) и пониженная экспрессия для 31 гена (гены ARG1, CD27, CD99, FKBP5, XCL1 и тд.) из 500 изученных генов, ассоциированных с работой иммунной системы, при ХК. Нами были замечены индивидуальные статистически значимые различия в профилях экспрессии генов, ответственных за врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет у больных с ХК, что свидетельствует о индивидуальной генетической предрасположенности к ответу на тот или иной внешний экологический фактор. Среди 55 генов, имеющих статистически значимую измененную экспрессию в сравнении с контрольной группой, были гены, которые могли характеризовать отдельные звенья патогенеза развития ХК: работа генов HLA класса I и ингибирование работы генов HLA класса II, индукция процессов апоптоза, запуск пролиферации T и B-клеток, иммунный ответ на воспаление, антимикробный сигнальный путь. Была замечена митотическая активность клеток периферической крови, которая выявляется экспрессией генов, контролирующей течение клеточного цикла на разных его фазах. Возможность одновременного анализа большого

количества генов, ассоциированных с работой иммунной системы, позволяет оценить работу иммунной системы при патогенезе ЖК у больных, что в будущем позволит предложить диагностику, возможность таргетной терапии определенной генной сети, являющейся отдельным

# СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩАЯ ДНК КРОВИ КАК БИОМАРКЕР МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

<sup>1,2</sup> Паневина А.В., <sup>1,2</sup> Горбачева Т.М., <sup>1,2</sup> Башмаков В.Ю., <sup>1,2</sup>  
Солодских С.А., <sup>3</sup> Ащеулов А.Ю., <sup>2</sup> Михайлов А.А., <sup>2</sup> Мошуров  
И.П., <sup>1</sup> Маслов А.Ю., <sup>1</sup> Попов В.Н.

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет»

<sup>2</sup> Бюджетное учреждение здравоохранения Воронежской области «Воронежский областной клинический онкологический диспансер»

<sup>3</sup> Автономная некоммерческая организация «Научно – исследовательский институт постгеномных технологий»

## Цель

Целью выполнения исследования является разработка методических подходов для персонифицированной ранней диагностики образования метастазов первичной опухоли и создание технологии производства индивидуального диагностического теста для максимально доступного, экономически приемлемого и неинвазивного мониторинга развития метастазов опухоли на основе анализа нектелочной свободно циркулирующей ДНК крови пациента

## Материалы и методы

Объектами исследования являлись 4 пациента Воронежского областного клинического онкологического диспансера в возрасте от 50 до 75 лет с гистологически подтвержденным светлоклеточным ПКР.

гДНК и сцДНК выделялась из биоматериала (ткань почки и кровь) при помощи наборов реагентов Zymo Research QuickgD-NA MiniPrep и QIAamp Circulating Nucleic Acid, соответственно. Для секвенирования исходного образца (опухоли) использован

секвенатор производства фирмы Life Technologies (США) Ion Torrent PGM и набор праймеров Comprehensive Cancer Panel для целевого ресеквенирования кодирующих последовательностей (экзонов) наиболее значимых онкогенов и первичного анализа генетического материала опухоли. Последовательности ДНК из опухолевого образца почки сравнивались с ДНК из здоровой ткани для установления индивидуального профиля соматических перестроек, характерных только для данного пациента и данной опухоли. Далее нами разрабатывался персонифицированный набор праймеров для проведения количественной полимеразной цепной реакции для определения концентрации опухолевой ДНК, т.е. фрагментов ДНК, несущих характеристические мутации в неклоточной свободно циркулирующей ДНК крови. При помощи аллель-специфической-ПЦР оценивалась мутационная нагрузка и вероятность наличия метастазов.

## **Результаты**

Разработаны методика определения мутаций ДНК как биомаркеров для систематического мониторинга сцДНК пациента с целью ранней диагностики метастазирования и/или рецидива опухоли, методика дизайна комплекта ПЦР праймеров, проведены испытания экспериментальных образцов набора реагентов для персонифицированной диагностики, разработан программный комплекс анализа результатов секвенирования ДНК и дизайна праймеров.

## **Заключение**

Послеоперационный мониторинг производится с помощью методик, не позволяющих своевременно выявить начало метастазирования. Предлагаемая методика анализа позволит резко снизить смертность от метастазов среди больных, прошедших курс лечения, и продолжающих отслеживать состояние заболевания после операции.

Данные, полученные в результате исследования, позволяют сделать вывод о Исследование поддержано грантом Министерства образования и науки Российской Федерации № 14.547.21.0027 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57414X0027).



**ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАКСЕНА НА СТЕПЕНЬ  
ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК И АКТИВНОСТЬ КАСПАЗ  
У БОЛЬНЫХ С ГЕПАТИТАМИ  
РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ**

**Попов С.С.<sup>1</sup>, Шульгин К.К.<sup>2</sup>, Агарков А.А.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»*

*<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»*

**Ключевые слова:** гепатит, фрагментация ДНК, каспазы, мелаксен.

Интенсификация свободнорадикального окисления (СО) биомолекул при лекарственном гепатите (ЛГ), а также при неалкогольном стеатогепатите (НАСГ), взаимосвязанная с чрезмерной генерацией активных форм кислорода (АФК), по-видимому, может быть сопряжена с возрастанием активности апоптотических процессов. Усиление процессов программируемой клеточной смерти характерно для многих заболеваний, включая алкогольный гепатит и цирроз печени [1]. Считают, что фрагменты ДНК возникают под действием апоптоз-специфичных нуклеаз в терминальной фазе апоптоза [2]. В ходе деградации ДНК сначала образуются крупные фрагменты, длиной примерно 300 т.п.н., несколько позже – 30–50 т.п.н. На следующем этапе в ходе межнуклеосомной деградации ДНК под действием кальций-чувствительной эндонуклеазы CAD (caspase-activated DNase) формируются фрагменты длиной 180 п.н. или кратные им. Именно эти фрагменты электрофоретически выявляются в виде «апоптотической лестницы». Как известно, подобная фрагментация ДНК может быть связана с протеолитическим расщеплением

под действием каспаз и ДНК-топоизомеразы II, участвующей в формировании супервитков ДНК [3]. С участием каспазы-3 подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК. Каспазы вызывают также гидролиз белков ламинов, армирующих ядерную мембрану, что ведет к конденсации хроматина. Они участвуют в разрушении белков, поддерживающих структурно-функциональное состояние цитоскелета, а также в инактивации и нарушении регуляции белков, участвующих в репарации ДНК, сплайсинге мРНК и репликации ДНК. Целью работы явилось исследование воздействия мелатонин-корректирующего препарата – мелаксена, на степень фрагментации ДНК и активность каспаз у больных с ЛГ и НАСГ.

Группа пациентов с НАСГ (33 человека) находилась на базисном лечении, включающем гипогликемические препараты, витамины В1, В6, В12. Группа пациентов с ЛГ (35 человек) находилась на базисном лечении, включающем гепатопротекторы, витамин В1. Вторая группа пациентов с НАСГ, ЛГ дополнительно к базисной терапии получала мелаксен (Unifarm, Inc., США) по одной таблетке, содержащей 3 мг мелатонина, 1 раз в день за 30-40 минут перед сном в течение 10 дней. Исследуемые показатели сыворотки крови пациентов сравнивали со значениями 65 практически здоровых людей в возрасте от 21 до 52 лет с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови.

Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора «К-Сорб» (СИНТОЛ, Россия) согласно инструкции производителя.

Фрагментацию ДНК выявляли путем проведения электрофореза образца ДНК в агарозном геле с использованием буфера трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ).

Определение активности каспаз-1 и -3 проводили с помощью

набора реактивов caspase 1 Assay Kit, colorimetric и caspase 3 Assay Kit, colorimetric соответственно (Sigma) на спектрофотометре Hitachi U1900 с программным обеспечением. Активность каспаз выражали в пикомолях продукта, образующегося в 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Достоверными считались различия при  $p \leq 0,05$ .

Проведена оценка фрагментации ДНК, а также осуществлено определение активностей каспазы-1 и каспазы-3 в крови пациентов с лекарственным гепатитом, развивающимся на фоне противотуберкулезной терапии и НАСГ, развивающимся при СД2. Каспаза – 1, относящаяся к членам семейства ICE, способствует активации ряда эффекторных каспаз, в том числе каспазы-3. Каспаза-3, являющаяся членом Ced-3 семейства, способна в дальнейшем к самостоятельной активации (автокатализу или автопроцессингу), она активирует ряд других протеаз семейства каспаз. После этого процесс, запущенный программой смерти, оказывается необратимым [4].

В ходе проведенных исследований была выявлена фрагментация ДНК, выделенной из лимфоцитов крови больных с исследуемыми патологиями, подтверждающаяся совокупностью полос («апоптотическая лестница»). При этом, активность каспазы-1 в сыворотке крови пациентов с лекарственным гепатитом и НАСГ возрастала в среднем в 2,5 и 1,7 раза соответственно, активность каспазы-3 – в 1,7 и 1,8 раза соответственно по сравнению с нормой. Это свидетельствует об усилении интенсивности апоптотических процессов в организме больных, которые приводят к конденсации ядерного хроматина и сморщиванию клетки при сохранности цитоплазматической мембраны. Следует отметить, что повышение активности каспазы-3 было также обнаружено в печени экспериментальных животных при моделировании токсического гепатита с помощью четыреххлористого углерода [5].

Проведение базисного лечения приводило к уменьшению степени фрагментации ДНК и снижению активности каспазы - 1 в сыворотке крови пациентов с ЛГ в среднем в 1,6 раза, с НАСГ – в 1,3 раза. Однако существенных изменений активности каспазы-3 в большинстве случаев выявлено не было. Так, после проведения базисного лечения ЛГ активность каспазы-3 в крови пациентов снижалась в среднем на 8,1%. Известно, что карсил и эссенциале обладают гепатопротекторным и мембраностабилизирующим действием, за счет чего защищают гепатоциты от действия токсинов.

Проведение комбинированной терапии, включающей мелаксен на фоне базисного лечения ЛГ сопровождалось уменьшением активности каспазы -1 и -3 в 2,2 и 1,4 раза соответственно. При приеме мелаксена в ходе лечения НАСГ также происходило снижение активности каспазы - 1 (в 1,7 раза) и каспазы – 3 (в 1,6 раза). При этом апоптотическая лестница в большинстве проб была мало выражена, а в ряде случаев практически не визуализировалась.

Полученные данные указывают на положительный эффект мелаксена на свободнорадикальный гомеостаз организма. По-видимому, реализация мелатонином своих антиоксидантных свойств, благодаря которым он эффективно взаимодействует со свободными радикалами с образованием малотоксичных или нетоксичных, метаболизируемых в организме соединений, способствовала торможению апоптотических процессов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попова Т.Н. Свободнорадикальные процессы в биосистемах / Т.Н. Попова [и др.] – Воронеж: Изд-во ИПК «Кириллица». – 2008. – 192с.
2. Gp120 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine. Muller K. [et al.] // Eur. J. Pharmacol. - 1992. - Vol. 226, № 6. - P. 209–214.
3. Earnshaw W.C. Nuclear changes in apoptosis / W.C. Earnshaw //

Curr. Opin. Cell Biol. – 1995. – Vol. 7, № 3. – P. 337–343.

4. Суханова Г.А. Апоптоз / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева. – Томск: Изд-во ТПУ. – 2009. – 172с.

5. Лемза С.В. Фармакотерапевтическая эффективность комплексного растительного средства «гепатон» при экспериментальном повреждении печени / С.В. Лемза, [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 72., № 2. – С. 181–184.

Работа поддержана стипендией Президента РФ молодым ученым №СП-1606.2015.4

## ПРИМЕНЕНИЕ ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ ПОСЛЕ РАДИКАЛЬНОЙ МАСТЭКТОМИИ

Савельев В.Н., Козлов С.В., Ткачев М.В., Борисов А.П.,  
Кочетков Р.И., Каганов О.И.

*ГБОУ ВПО Самарский государственный медицинский  
университет*

**Аннотация.** Применение гипербарической оксигенации после радикальной мастэктомии дает возможность сохранить жизнеспособность тканей, ускоряя восстановительные процессы.

**Ключевые слова:** гипербарическая оксигенация, радикальная мастэктомия, восстановительный процесс.

## APPLICATION HYPERBARIC OXYGENATION AF- TER RADICAL MASTECTOMY

V.N. Savelyev, S.V. Kozlov, M.V. Tkachev, A.P. Borisov, R.I.  
Kochetkov, O.I. Kaganov

Samara State Medical University

**Abstract.** The use of hyperbaric oxygenation after radical mastectomy makes it possible to preserve the viability of the tissues, accelerating the recovery processes.

**Keywords:** hyperbaric oxygen therapy, radical mastectomy, reconstruction process.

Актуальность. Лимфорея после радикальной мастэктомии (РМЭ) отмечается в 100% случаев и является закономерным

явлением [1]. Появление лимфорреи более вероятно у больных преклонного возраста, с избыточной массой тела, сниженными регенеративными способностями тканей [2]. При неблагоприятном течении после оперативного лечения формируется грубыми фиброзными стенками, в которой постоянно скапливается жидкость, в результате чего послеоперационный период заживления затягивается [3]. Длительная лимфоррея создает благоприятную среду для развития микроорганизмов [4]. Барокамера является единственным медицинским приспособлением, позволяющие проводить интенсивную кислородотерапию [5]. Метод гипербарической оксигенации (ГБО) заключается во вдыхании кислорода при окружающем давлении, превышающем одну атмосферу, его растворении в плазме крови и проникновении через капилляры в ткани организма, повышая их насыщенность [6]. При помощи барокамеры, возможно, увеличить содержание кислорода в тканях организма в 20 раз превышающее обычный уровень, не подвергая при этом пациента опасности развития каких-либо осложнений [7]. Подобная высокая дозировка кислорода ведёт к запуску различных физиологических механизмов, способствующих восстановлению тканей [8]. Кислород необходим при различных физиологических процессах, связанных с заживлением ран, в том числе. для нормальной работы белых клеток крови (лейкоцитов), роль которых заключается в борьбе с инфекцией, остеокластов и остеобластов, участвующих в разрушении и образовании костной ткани, фибробластов, вырабатывающих коллаген, необходимый для регенерации тканей при заживлении ран и т. д. [9].

**Цель работы:** Изучение влияния гипербарического кислорода в раннем послеоперационном периоде после РМЭ у больных раком молочной железы.

**Материалы и методы исследования:** исследована возможность использования ГБО с целью повышения регенеративных способностей тканей. Больные были разделены на две группы сравнения: 1 группа - больные, которым проводилась ГБО после оперативного лечения (25 человек); 2 группа больных- ГБО

не проводилось (30 человек). Возраст больных составил от 35 лет до 60 лет. Средний возраст  $48,5 \pm 2,3$  года при I и II стадиях заболевания. Сеансы проводились в одноместной барокамере БЛКС-303 один раз в сутки на режиме 1,4 Атм, время изопрессии 40 мин. Курс 5 сеансов.

**Результаты исследования.** У больных I группы отмечалось снижение лимфорреи в два раза (с 230мл до 120 мл) на 3-4 день после начала применения ГБО, а также уменьшение интенсивности болевого синдрома на 2 сутки, чего не было у больных II группы.

**Выводы:** Раннее применение ГБО при РМЭ дает возможность сохранить жизнеспособность тканей, способствует формированию эластичной рубцовой ткани. По мере восстановления функции верхней конечности включаются коллатеральные пути оттока лимфы, что ускоряет восстановительные процессы.

Список литературы:

1. Козлов С.В., Каганов О.И., Кутырева Ю.Г., Торопова Н.Е., Ткачев М.В., Козлов А.М., Швец Д.С. Применение онкомаркеров при мониторинге результатов лечения больных с метастазами колоректального рака // Медицина критических состояний. 2014. № 2. С. 26-29.
2. М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Прогностический критерии колоректального рака [Текст] // VI ежегодная Международная научная Интернет - конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX
3. Ткачев М.В. Мониторинг результатов радиочастотной термоабляции колоректальных метастазов печени с применением онкомаркеров // Аспирантский вестник Поволжья. 2014. № 5-6. С. 112-115.
4. Козлов С.В., Каганов О.И., Морятов А.А., Козлов А.М., Ткачев М.В., Швец Д.С. Место радиочастотной термоабляции в комбинированном лечении больных с билобарными метастазами в печени // Поволжский онкологический вестник. 2014. № 1. С.



31-39.

5.М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Прогностические факторы при колоректальном раке [Текст] // VI ежегодная Международная научная Интернет - конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX

6.Пат. 2523138 РФ. Способ прогнозирования риска развития прогрессии заболевания после выполнения радиочастотной термоабляции метастазов колоректального рака в печень / Каганов О.И., Козлов С.В., Швец Д.С., Ткачев М.В., Каганова М.А. Оpub. 07.03.2013

7.Козлов С.В., Каганов О.И., Ткачев М.В., Козлов А.М., Швец Д.С. Метод радиочастотной термоабляции в лечении больных с множественными билобарными метастазами колоректального рака в печени // Российский онкологический журнал. 2014. Т. 19. № 4. С. 27-28.

8.М.В. Ткачев, И.В. Ткачева. Методы профилактики постабляционного синдрома [Текст] // VI ежегодная Международная научная Интернет -конференция Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: сб. научн. тр. / Казань. 2015 XX-XX

9.Козлов С.В., Каганов О.И., Ткачев М.В., Козлов А.М., Швец Д.С. Применение радиочастотной термоабляции в комбинированном лечении больных с билобарными метастазами колоректального рака в печени // Международный научно-исследовательский журнал. 2014. № 3-4 (22). С. 114.

**ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ  
НА ОСНОВЕ ПАНТОГАМА, СУКЦИНАТА И  
ХИТОЗАНА НА СТЕПЕНЬ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК  
ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННОМ  
ИШЕМИЕЙ/ РЕПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**Сафонова О.А., Попова Т.Н.**

*ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»*

Как известно, к одним из наиболее распространенных заболеваний, часто сопровождающихся инвалидизацией и смертностью населения, относят острые нарушения мозгового кровообращения. В гибели нервной ткани при ишемии, также как и при других патологических состояниях, важную роль играет интенсификация свободнорадикального окисления (СО) [1]. Доказано также участие активных форм кислорода (АФК) в запрограммированной гибели клеток – апоптозе [2]. Соответственно показатели, характеризующие скорость протекания свободнорадикальных и апоптотических процессов, могут быть использованы в качестве критериев для оценки степени развития и эффективности коррекции ряда заболеваний. В терапии ишемических повреждений мозга значительное место отводят применению ноотропных, нейропротекторных и антиоксидантных препаратов. В этом плане интерес вызывают средства на основе пантогама, янтарной кислоты (ЯК) и хитозана [3-5].

Целью данной работы явилось исследование влияния фармакологических средств на основе этих соединений на интенсивность свободнорадикальных и апоптотических

процессов при ишемии/ реперфузии головного мозга (ИРГМ) у крыс.

В опытах использовали белых лабораторных крыс-самцов массой 150-200 г. ИРГМ воспроизводили под наркозом путем 30-минутной окклюзии общих сонных артерий [6]. Спустя 3 суток животных забивали. В качестве контроля использовали ложноперированных животных (1-я группа). 2-ю группу составили крысы с патологией. Животным 3-ей группы на фоне развития ИРГМ вводили внутривентрикулярно смесь пантогама, ЯК и низкомолекулярного хитозана в соотношении 4:4:1 в дозе 11 мг/кг веса дважды в день в течение 3-х суток. По той же схеме вводили пантогам в дозе 5 мг/кг (4-я группа), ЯК в дозе 5 мг/кг (5-я группа) или хитозан в дозе 1,25 мг/кг веса (6-я группа). Животным 7-й группы вводили сукцинат низкомолекулярного хитозана в дозе 6 мг/кг, 8-й - N-сукцинилхитозан в дозе 6 мг/кг. Тестируемые средства были получены на фармацевтическом факультете ВГУ.

Уровень процессов СО оценивали методом биохемилюминесценции (БХЛ), индуцированный  $Fe^{2+}$  и  $H_2O_2$ . Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора «К-Сорб» («Синтол», Россия). Для оценки фрагментации ДНК осуществляли электрофорез в 1,5%-ном агарозном геле с использованием буфера трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ).

В группах животных с патологией, которым вводили тестируемые средства, было отмечено изменение параметров БХЛ, возрастающих в условиях развития ИРГМ [7], в сторону контроля. Так, при введении комплексного фармакологического средства происходило уменьшение светосуммы (S) БХЛ в ткани мозга в 2,0 раза относительно ИРГМ. При введении пантогама или ЯК животным данный показатель уменьшался в 1,5 раза, хитозана - в 1,3 раза, сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана - в 2,0 и 1,8 раза соответственно.

У крыс 3-ей группы интенсивность максимальной вспышки ( $I_{max}$ ) БХЛ снижалась в мозге в 2,1 раза. При введении животным с патологией пантогама, ЯК или хитозана данный показатель уменьшался в 1,6, 1,4 и в 1,2 раза соответственно. В 7-ой и 8-ой группах крыс было выявлено снижение значений  $I_{max}$  БХЛ в 2,2 и 1,8 раза соответственно.

Полученные данные могут быть объяснены с точки зрения способности пантогама, ЯК и хитозана нормализовать метаболические процессы, проявлять антиоксидантные свойства. Сравнительный анализ влияния данных соединений на S и  $I_{max}$  БХЛ показал, что наиболее значительное изменение в сторону контроля происходит при введении животным с ИРГМ пантогама и ЯК, что может объясняться их прямым нейропротекторным влиянием, в частности, коррекцией биоэнергетических процессы в нейронах [3,4]. При сравнении действия сукцината хитозана и N-сукцинилхитозана был обнаружен более выраженный эффект первого соединения, по-видимому, вследствие более высокой скорости образования свободных ионогенных функциональных групп.

ДНК, выделенная из мозга крыс с ишемией/ реперфузией, была фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб, причем фрагменты ДНК формировали характерную «апоптотическую лестницу». Подобные фрагменты возникают при действии апоптоз-специфических нуклеаз [8]. В индукции апоптотических процессов могут принимать участие АФК [2], уровень которых при данной патологии возрастает, что подтверждается данными по оценке параметров БХЛ. Наблюдается также высокоподвижная полоса в области низких молекулярных масс, соответствующая деградированной ДНК, что характерно для процесса некроза [9]. Введение тестируемых фармакологических средств животным с ИРГМ приводило к снижению степени фрагментации ДНК, что может быть свидетельством их антиапоптотического и антиоксидантного действия. Наибольший эффект оказывали комплексное фармакологическое средство, сукцинат хитозана

и N-сукцинилхитозан. В этих случаях апоптотическая лестница в большинстве проб практически не визуализировалась.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности тестируемых фармакологических средств снижать степень развития окислительного стресса и скорость апоптотических процессов при ИРГМ, вследствие чего они могут представлять значительный интерес с точки зрения фармакологической коррекции изменений метаболизма при развитии патологий подобного рода.

Работа поддержана грантами РФФИ р\_центр\_а №13-04-97536 и РФФИ мол\_а № 14-04-32174.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг / А.А. Болдырев // Сорос. образов. журн. - 2001. - Т. 7, № 4. - С. 21-28.
2. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.]. - М.: Слово, 2006. - 556 с.
3. Бадалян О.Л. Возможности применения пантогама в практике невролога / О.Л. Бадалян, С.Г. Бурд // Фарматека. - 2006. - № 5. - С. 52-56.
4. Коваленко А.В. Янтарная кислота: фармакологическая активность и лекарственные формы / А.В. Коваленко, Н.В. Белякова // Фармация. - 2000. - № 5-6. - С. 40-43.
5. Biopolymers for medical and pharmaceutical applications / Ed. by A. Steinbeuchel, R.H. Marchessault. - Vol.1. - Weinheim: Wiley-VCH, 2005. - 1145 p.
6. Коррекция последствий постишемического реперфузионного повреждения головного мозга цитофлавином / В.В. Бульон [и др.] // Бюлл. exper. биол. и мед. - 2000. - Т. 129, № 2. - С. 149–151.
7. Влияние производных гуанидина на интенсивность свободнорадикального окисления и активность аконитазы при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс / А.В. Макеева [и др.] // Биомед. химия. - 2009. - Т. 55, № 5. - С.643-650.
8. Muller K. Gpl20 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell

cultures: prevention by memantine. / K. Muller // Eur. J. Pharmacol. - 1992. - V. 226, N 6. - P. 209-214.

9. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патол. физиол. эксп. терап. – 1998. – Т. 2. – С. 38-48.

**БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ  
АНТИБИОТИКА ЦЕФАЛОТИНА  
РЕКОМБИНАНТНОЙ СИНТЕТАЗОЙ  
ЦЕФАЛОСПОРИНОВ-КИСЛОТ**

**Скляренко А.В.<sup>1</sup>, Чеперигин С.А.<sup>1</sup>, Медведева Н.В.<sup>1</sup>, Жгун  
А.А.<sup>2</sup>, Сатарова Д.Э.<sup>1</sup>, Сидоренко А.И.<sup>1</sup>, Думина М.В.<sup>2</sup>,  
Эльдаров М.А.<sup>2</sup>, Козлов Д.Г.<sup>1</sup>, Яроцкий С.В.<sup>1</sup>**

*1 - ФГУП «ГосНИИгенетика»*

*2 - ФИЦ «Биотехнологии» РАН*

**Аннотация.** С использованием рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМВ-12206, эффективно продуцирующего фермент синтетазу цефалоспоринов-кислот (Cephalosporin-acid synthetase, CASA), получен гетерогенный биокатализатор, представляющий собой фермент CASA, иммобилизованный на эпокси-активированном макропористом акрилатном носителе. Продемонстрирована возможность высокоэффективного синтеза парентерального антибиотика цефалотина из 7-аминоцефалоспориновой кислоты и тиенилуксусной кислоты с помощью данного биокатализатора. При прямом биокаталитическом синтезе за 210 мин процесса достигнут более чем 60% выход целевого антибиотика по отношению к  $\beta$ -лактам-содержащему субстрату при отсутствии побочных процессов.

**Ключевые слова:** синтетаза цефалоспоринов-кислот, рекомбинантный фермент, цефалотин, биокаталитический синтез.

# BIOCATALITIC SYNTHESIS OF CEFALOTHIN BY RECOMBINANT CEPHALOSPORIN-ACID SYNTHETASE

A.V.Sklyarenko<sup>1</sup>, S.A.Cheperigin<sup>1</sup>, N.V.Medvedeva<sup>1</sup>, A.A.Zhgun<sup>2</sup>, J.E.Satarova<sup>1</sup>, A.I.Sidorenko<sup>1</sup>, M.V.Dumina<sup>2</sup>, M.A.El-darov<sup>2</sup>, D.G.Kozlov<sup>1</sup>, S.V.Yarotsky<sup>1</sup>.

1 - SRI "GosNIIGenetika",

2 - FRC "Fundamentals of Biotechnology" RAS.

**Abstract.** Heterogeneous biocatalyst based on recombinant cephalosporin-acid synthetase (CASA), produced by E.coli strain VKPM V-12206 was obtained through CASA immobilization on epoxy-activated macroporous acrylic support. Using this biocatalyst efficient synthesis of cephalothin antibiotic was demonstrated starting with 7-aminocephalosporanic acid and tienylacetic acid. In the course of direct biocatalytic synthesis, more than 60% transformation level of cephalothin was obtained after 210 minutes of synthesis as compared to beta-lactam substrate in the absence of contaminating side processes.

**Key words:** cephalosporin-acid synthetase, recombinant enzyme, cephalothin, biocatalytic synthesis.

## ВВЕДЕНИЕ

Полусинтетические пенициллины и цефалоспорины относятся к важному классу бета-лактамовых антибиотиков, которые занимают 65 % общего мирового рынка антибиотиков [1] с объемом продаж более 20 миллиардов долларов в год. Подкласс цефалоспоринов-кислот включают более полутора десятков полусинтетических  $\beta$  лактамных антибиотиков, в том числе такой клинически значимый антибиотик широкого спектра действия как цефалотин [1]. Использование биокаталитических методов для синтеза  $\beta$  лактамов взамен традиционных химических технологий открывает перспективы создания экологически



чистых и экономичных процессов получения антибиотиков [2,3]. Ключевым фактором при этом является использование рекомбинантных штаммов – продуцентов ферментов, специфичных к синтезу полусинтетических антибиотиков из соответствующих □ лактам-содержащих полупродуктов.

Синтетаза цефалоспоринов-кислот (Cephalosporin-acid synthetase, CASA) штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-10182 специфична к синтезу цефазолина и других антибиотиков класса цефалоспоринов-кислот [4]. На основании данных расшифровки и анализа геномной последовательности штамма ВКПМ В-10182 нами идентифицирован ген CASA, создан эффективный рекомбинантный штамм *E. coli* ВКПМ В-12206 - продуцент CASA [5,6], разработан способ иммобилизации CASA на эпокси-активированном макропористом акрилатном носителе с получением гетерогенного биокатализатора (БК) [7]. Настоящее сообщение посвящено описанию использования созданного БК для синтеза антибиотика цефалотина (ЦЛТ).

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Процесс синтеза ЦЛТ проводили в следующих условиях: 30 °С; постоянное значение рН 6,00 □ 0,05; начальная концентрация 7-АЦК – 65 мМ; начальная концентрация ТУК – 265 мМ. В качестве БК использовали образец CASA (ИФСА), иммобилизованной на Relizyme™ EP113/S (Resindion S.R.L., Италия) с удельной активностью 240 МЕ/г влажного БК и общей активностью 40 МЕ.

Исходная реакционная смесь представляла собой суспензию из-за низкой растворимости 7 АЦК при рН 6,0 (10 мМ в 0,1 М NaCl при 20 ° С). Так как в ходе процесса прямого синтеза не происходит выделение кислоты, значение рН не изменялся, сохраняясь на заданном уровне рН 6,0.

Состав реакционной смеси в пробах, отбираемых по ходу

процесса, анализировали методом ВЭЖХ в режиме ступенчатого градиента содержания метанола в подвижной фазе, состоящей из 0,05 М фосфатно-аммонийного буфера, рН 2,1 и метанола, при скорости потока подвижной фазы 2 мл/мин. Использовали хроматографическую колонку, заполненную сорбентом «Spherisorb ODS». Содержание метанола в подвижной фазе и скорость потока регулировали автоматически с помощью компьютерного программного обеспечения МультиХром версии 3.х. Детектирование вели при длине волны 214 нм. Условия проведения анализа методом ВЭЖХ и времена удерживания анализируемых компонентов реакционной смеси даны в таблице.1.

Относительное содержание ТУК в реакционной смеси в текущий момент времени рассчитывали по отношению содержанию ТУК в исходной реакционной смеси. Баланс по соединениям, несущим  $\beta$  лактамное ядро, рассчитывали как сумму относительного содержания в реакционной смеси 7-АЦК и ЦЛТ. Баланс по соединениям, несущим остаток ТУК, рассчитывали как сумму относительного содержания в реакционной смеси ТУК и ЦЛТ.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фермент CASA, продуцируемый рекомбинантным штаммом *E. coli* ВКПМ В 12206, катализирует синтез цефалоспоринов-кислот путем ацилирования аминогруппы ключевой аминокислоты, несущей  $\beta$  лактамное ядро антибиотика, соответствующей карбоновой кислотой, содержащей боковую цепь антибиотика. Синтез ЦЛТ из ключевой аминокислоты 7 АЦК осуществляли методом прямого (термодинамически контролируемого) синтеза [8], согласно схеме, приведенной на Рис.1, используя в качестве ацилирующего агента свободную ТУК. Динамика изменения состава реакционной смеси при прямом синтезе ЦЛТ под действием ИФСАСА представлена на Рис.2, где показанное на оси ординат относительное содержание таких компонентов

реакционной смеси как 7-АЦК и ЦЛТ в текущий момент времени рассчитано по отношению содержанию 7-АЦК в исходной реакционной смеси. Следует отметить, что динамика изменения относительного содержания ЦЛТ отражает зависимость от времени степени трансформации 7-АЦК в целевой продукт, то есть выхода целевого антибиотика ЦЛТ по отношению к  $\beta$ -лактам-содержащему субстрату.

При прямом биокаталитическом синтезе ЦЛТ из 7-АЦК и ТУК, катализируемом ИФСАСА, за 210 мин процесса достигнут выход ЦЛТ по отношению к  $\beta$ -лактам-содержащему субстрату 7-АЦК =63 % (Рис.2). Существенно, что по ходу процесса сохраняются балансы как по  $\beta$ -лактаму, так и по остатку ТУК, что свидетельствует об отсутствии побочных процессов. Ход кривой накопления антибиотика показывает, что при заданной нагрузке по ферментативной активности (40 МЕ/мл) для достижения термодинамического равновесия требуется большее время. Известно, что термодинамический выход ЦЛТ при 40°C; концентрации субстрата равной 50 мМ и соотношении ацилирующего агента к ключевой аминокислоте  $X_0=4$  М/М составляет 80 % [1].

Таким образом, показано, что разработанный БК на основе рекомбинантной САСА обеспечивает синтез антибиотика цефалотина, относящегося к классу цефалоспоринов-кислот.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтетаза цефалоспоринов-кислот, продуцируемая рекомбинантным штаммом *E. coli* ВКПМ В-12206 и используемая в технологически удобной форме иммобилизованного фермента, обеспечивает эффективный синтез антибиотика цефалотина с выходом порядка 60 % от соответствующей ключевой аминокислоты 7-АЦК при четырехкратном мольном избытке ацилирующего агента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки

РФ – Соглашение о предоставлении субсидии №14.604.21.0022 от 17.06.2014, уникальный идентификатор соглашения RFME-FI60414X0022.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ныс П.С., Курочкина В.Б., Скляренко А.В. В.Г.А. Беталактамы соединения. Взаимосвязь структуры и биологической активности. // Антибиот Химиотер. 2000. Vol. 45, № 11. P. 36–42.
2. Sklyarenko A.V., Kurochkina V.B. E.A.M. Enzymatic transformation and synthesis of beta-lactam antibiotics. // Egorov A.M. Zaikov G. New Res. Biotechnol. Biol. Med. – Nov. Sci. Publ. 2006. № Chapter 8. P. 73–86.
3. Скляренко А.В., Эльдаров М. А., Курочкина В. Б Я.С.В. Ферментативный синтез бете-лактамовых кислот // Прикл. биохим микробиол. 2015. Vol. 51, № 6. P. 546–560.
4. Патент RU2420581 C12N11/04. Способ получения биокатализатора, обладающего активностью в отношении синтеза цефалоспоринов-кислот. 2011.
5. Mardanov A. V et al. Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain VKPM B-10182, Producing the Enzyme for Synthesis of Cephalosporin Acids. // Genome Announc. 2014. Vol. 2, № 6.
6. Эльдаров М.А., Скляренко А.В., Марданов А.В, Белецкий А.В., Жгун А.А., Думина М.В., Медведева Н.В., Сатарова Д.Э., Равин Н.В. Я.С.В. Синтетаза цефалоспориновых кислот штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-10182: геномный контекст, идентификация гена, создание штамма-продуцента // Прикл.биохим микробиол. 2015. Vol. 51, № 5. P. 546–561.
7. Рекомбинантная синтетаза цефалоспоринов-кислот: оптимизация экспрессии в клетках *E.coli* иммобилизация и использование для биокаталитического синтеза цефазолина. Эльдаров М.А., Скляренко А.В., Думина М.В., Медведева Н.В., Жгун А.А., Сатарова Д.Э., Сидоренко А.И., Епремян А.С., Яроцкий С.В. // Биомедицинская химия. 2015. Vol. 61, № 5. P. 5–12.

8. Kurochkina V.B., Nys P.S. Kinetic and Thermodynamic Approach to Design of Processes for Enzymatic Synthesis of Betalactams // Biocatal. Biotransformation. Informa UK Ltd UK, 2002. Vol. 20, № 1. P. 35–41.

Таблица 1. Условия анализа методом ВЭЖХ реакционной смеси, образующейся при биокаталитическом синтезе цефалотина

№	Градиент			Время удерживания компонента, мин		
	Время, мин	Метанол: буфер, (v:v)	Скорость потока, мл/мин	ТУК	7-АЦК	ЦЛТ
1	0-2,0	15:75	2,0		1,7-1,8	
2	2,0-8,0	40:60	2,0	5,9-6,0		7,9-8,1
3	8,0-12,0	15:75	2,0			

# ТРАНСКРИПТОМНЫЙ И ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ КЛЮЧЕВЫХ ПРИЧИН ИЗМЕНЕНИЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КАНОНИЧЕСКИХ СИГНАЛЬНЫХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ НА ПРИМЕРЕ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ.

Солодских С.А.<sup>1,3</sup>, Паневина А.В.<sup>1,3</sup>, Башмаков В.Ю.<sup>1,3</sup>,  
Горбачева Т.М.<sup>1,3</sup>, Ащеулов А.Ю.<sup>3</sup>, Михайлов А.А.<sup>2</sup>, Мошуров  
И.П.<sup>2</sup>, Маслов А.Ю.<sup>1</sup>, Попов В. Н.<sup>1</sup>

*1 – ФГБОУ ВПО «Воронежский Государственный Университет»,  
Воронеж, Россия;*

*2 – БУЗ ВО «Воронежский областной клинический онкологический  
диспансер»;*

*3 – АНО «Научно-исследовательский институт постгеномных  
технологий»*

## **Введение**

Почечно-клеточный рак (ПКР) – рак почки, представляющий собой злокачественное образование проксимальных почечных канальцев. ПКР – наиболее распространенный вид рака почек у взрослых, встречающийся в 80% случаев. Является основной причиной смертности при раке выделительной системы. Наиболее популярное и эффективное лечение – частичная или полная нефрэктомия. Пятилетняя выживаемость при паренхиматозном происхождении опухоли составляет 60-70%, однако при возникновении метастазов выживаемость значительно снижается. Опухоль относительно резистентна к лучевой терапии и химиотерапии, но в некоторых случаях отвечает на иммунотерапию. Таргетные препараты (сунитиниб, бевацизумаб,

$\alpha$ -интерферон, сорафениб) оказывают существенное влияние на ПКР. Наиболее релевантными причинами развития ПКР являются курение, ожирение и артериальная гипертензия (около 50% случаев). Предположительно, фактором риска также может быть воздействие асбеста, кадмия, свинца, соединений хлора, полициклических ароматических углеводородов, нестероидных противовоспалительных препаратов. Также ПКР развивается в 2 раза чаще у женщин, перенесших гистерэктомию.

Полный спектр мутаций характерный для данного вида рака изучен недостаточно. Также в дополнительном изучении нуждаются метаболические и сигнальные пути, задействованные в развитии ПКР, эпигенетические факторы развития заболевания и профили экспрессии в различных видах рака.

### **Материалы и методы:**

Объектами исследования являлись 25 пациентов Воронежского областного клинического онкологического диспансера в возрасте от 57 до 75 лет с гистологически подтвержденным светлоклеточным ПКР. РНК из образцов выделяли набором реактивов RNeasy® Mini kit (QIAGEN, США) согласно инструкции производителя. Качество материала оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, концентрацию измеряли на флуориметре Qubit® 2.0 (Life Technologies, США). Пробоподготовку для последующей гибридизацией с ДНК-микрочипами осуществляли с использованием комплекта реактивов Ambion® WT Expression Kit (Life Technologies, США). В данном исследовании использовались ДНК-микрочипы Affymetrix® Human Gene ST 1.1 и система анализа Affymetrix® GeneAtlas®. Секвенирование ДНК проводилось на платформе In Torrent PGM (Life Technologies, США) с панелью праймеров Comprehensive Cancer Panel. Для анализа данных использовалось ПО Partek Genomics Suite v6.6, Ion Torrent Suite v.4.6 и БД Ingenuity Pathway Analysis.

Рассматривались только те мутации, которые приводят к замене

аминокислот в соответствующем белке, сдвигу рамки считывания или формированию урезанного транскрипта.

### **Результаты исследования и их обсуждение:**

Анализ методом главных компонент выявил 2 кластера, образованных данными опухолевых и нормальных тканей.

Целевое ресеквенирование ДНК выявило 36 мутаций в опухолевых тканях пациентов, не содержащихся в ДНК нормальной ткани. 19 из них были локализованы в генах *in* SDHB, TRIM33, PDE4D-IP, PBX1, ABL2, MTR, VHL, ROS1, PRKDC, CSMD3, MLLT10, TRIP11, PER1 и BCL2 и являлись опухолеспецифичными. 17 мутаций были обнаружены в промоторных зонах генов EGFR, PDGFRA и HNF1A

Экспрессия 3528 генов в опухолевых тканях была изменена более чем в 2 раза с уровнем значимости  $p < 0.05$  с поправкой на среднюю долю ложных отклонений. При этом экспрессия 196 генов отличалась более чем в 10 раз. Наибольшее снижение экспрессии было характерно для генов CALB1 (-187), HPD (-133.4), KNG1 (-127), SLC36A2 (-126.7), PAH (-122), SLC22A8 (-119), SLC12A1 (-109.8), UMOD (-95.7), SLC12A3 (-92.5), SLC34A1 (-80.65), XPNPEP2 (-77.8), CLDN8 (-76.4), PLG (-74.9), DIO1 (-72.1), SLC22A6 (-69.9), NPHS2 (-62.9), SLC13A3 (-60.3). Экспрессия следующих генов была увеличена: TNFAIP6 (34.6), ANGPTL4 (24.3), ANGPT2 (23.4), SERPINE1 (22.7), CP (20.7), HILPDA (20.2), VCAN (18.35), IDO1 (17.8), VWF (16.6), C3 (15.45), COL1A1 (14.2), LOXL2 (13.7), OLFML2B (13.3), ITGA5 (12.7), LAMA4 (12.6).

Мутации ДНК и профили экспрессии анализировались в составе одной выборки для определения взаимосвязей между мутациями и изменениями экспрессии отдельных генов, и установления влияния значащих мутаций на функционирование канонических сигнальных путей в клетке.



Наиболее репрезентативными по проценту представленных генов метаболическими путями из базы данных Ingenuity оказались «FXR/RXR Activation», «Atherosclerosis Signaling», «LXR/RXR Activation», «Production of NO and ROS in Macrophages», «Cell migration and adhesion».

Анализ мотивов связывания факторов транскрипции в промоторных зонах генов с дифференциальной экспрессией показал, что факторами транскрипции, обуславливающими наблюдаемые изменения экспрессии, являются PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , p53, TNF-1 $\alpha$ , FOXC2, SGK1, NR0B2, HNF1- $\alpha$ , HNF1- $\beta$  и HNF4- $\alpha$ .

### **Заключение**

Были проанализированы профили экспрессии и мутационные ландшафты 25 пар опухоль-норма пациентов с гистологически подтвержденным светлоклеточным ПКР. Выявлена дифференциальная экспрессия ряда генов с уровнем значимости  $p < 0,05$ . Установлена принадлежность полученных генов к каноническим метаболическим и сигнальным путям.

Разработанный метод интеграции геномных и транскриптомных данных позволяет определять причины варибельности уровней мРНК. Ряд мутаций и генов с измененной экспрессией, обнаруженные в этом исследовании, не содержатся в публичных базах данных аннотированных мутаций, что позволяет сделать вывод о популяционной гетерогенности в ряде случаев ПКР. Обнаруженные мутации и экспрессионные профили могут использоваться как биомаркеры и иметь применение в клинической практике.

Исследование поддержано грантом Министерства образования и науки Российской Федерации No 14.547.21.0027 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57414X0027).

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА IN SITU ГИБРИДИЗАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Суркова Е.И. , Сурков К.В., Елагина М.И.

*ООО “Микротесты в биологии, медицине и ветеринарии”*

**Аннотация.** Дано описание возможностей применения метода in situ гибридизации для диагностики злокачественных новообразований и назначения корректной схемы терапии. Приведены примеры использования зондов в конкретных исследовательских и клинических работах.

**Ключевые слова:** метод in situ гибридизации, зонды, микро

## PNK APPLICATION OF IN SITU HYBRIDIZATION METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF CANCER

E.I. Surkova, K.V. Surkov, M.I. Elagina

**Abstract.** The description of possibilities of in situ hybridization method for diagnosis of cancer and for determination of therapy strategy is given. Examples of using of probes in specific scientific and clinical researches are provided.

**Keywords:** in situ hybridization method, probes, microRNA

Хотя технологию гибридизации in situ (ГИС) нельзя назвать новой, применение её в клинической диагностике явно недостаточно. Ограничения применения этого метода были объективны и связаны с высокой трудоёмкостью и продолжительностью (более 2 суток) процесса, а также применением радиоактивных меток [1]. Однако в настоящее время есть возможность использования в технологии ГИС любых ферментных и флуоресцентных меток и сокращения сроков исследования до 3,5 часов [2], что

расширяет спектр применения ГИС в диагностических [3, 4] и исследовательских целях, в том числе в цитологии, клинической лабораторной диагностике, патологической анатомии и генетике [5].

Метод ГИС является качественным, в результате гибридизации происходит образование дуплекса из присутствующих в объекте исследования последовательностей и геноспецифического зонда. Зонды, гибридизующиеся с центромерными участками хромосом, позволяют по числу цветовых сигналов в интерфазном ядре определить число копий каждой хромосомы. Зонды, связывающиеся с определенными хромосомными локусами, позволяют установить наличие или отсутствие этих локусов, а также их перестройки. Может быть выполнен подсчёт сигналов гибридизации и результат исследования может быть статистически обработан, что повышает его эффективность. Часто ГИС используется в качестве контрольного метода при проведении иммуногистохимического (ИГХ) тестирования [6]. Использование ГИС является полезным для диагностики различных новообразований, таких как рак молочной железы, рак лёгкого, саркомы и опухолей кровеносной системы. Так, для диагностики рака молочной железы и назначения дальнейшей терапии незаменимым является выявление амплификации генов HER2 и TOP2A. Диагностическими и прогностическими маркерами для рака лёгкого являются: амплификация MET и FGFR1, инверсия ALK/EML4, перестройка ROS1 и RET. Для сарком мягких тканей полезным является применение ГИС для выявления транслокаций гена EWSR1. Использование флуоресцентной ГИС в данном случае позволяет, например, дифференцировать светлоклеточную саркому от злокачественной меланомы. К другим молекулярным маркерам, которые могут быть использованы для уточнения диагноза в случае сарком мягких тканей, относятся: SYT, FKHR, MDM2, COL1A1/PDGFB, TFE3, NR4A3, JAZF1, USP6. Для миелоидных новообразований определение транслокации гена BCR/ABL1 помогает выявить хроническую миелогенную лейкемию. Было показано, что

использование ГИС для определения моноклональности лимфоидных новообразований является более эффективным в связи с большей чувствительностью этого метода по сравнению с ИГХ для детекции каппа и лямбда лёгких цепей иммуноглобулинов.

Метод хромогенной ГИС объединяет в себе морфологический и генетический тест. Метод ГИС позволяет получить важную информацию о структуре и функционировании клеток при различных заболеваниях [7] и является полезным диагностическим и прогностическим инструментом. Кроме того, метод может использоваться для выявления остаточных явлений после химиотерапии и пересадки костного мозга. Велика роль ГИС при выборе пациентов, для которых применяемые современные химиотерапевтические средства дадут оптимальный результат [8]. Такой индивидуальный подход в назначении терапии позволяет снизить токсическую нагрузку на пациента.

Использование в методике ГИС зондов на основе микроРНК позволяет расширить спектр научных и диагностических задач. Особенно это касается появления высокочувствительных микроРНК зондов, меченых с двух концов 5' и 3'. Эффект кооперации двух меток увеличивает отношение сигнал-шум более чем в 10 раз, что позволяет выявлять даже микроРНК, представленные в малом количестве в клетках. Использование микроРНК в качестве зондов для ГИС помогает в ряде случаев более точно установить диагноз и дать прогноз прогрессии заболевания. Так, miR-126 является негативным прогностическим фактором при немелкоклеточном раке лёгкого [9], а miR-21 – при раке толстой кишки [10]. Сниженная экспрессия miR-205 коррелирует с более агрессивным поведением злокачественной мезотелиомы [11]. miR-375 показывает 98,3% диагностическую точность в отношении карциномы щитовидной железы [12]. А miR-21 гиперэкспрессируется в злокачественных мезотелиомах плевры, тогда как в нормальной мезотелии экспрессия этой микроРНК незначительна [13]. В филоидных опухолях была

выявлена гиперэкспрессия miR-155 и miR-200c [14], что позволяет отличить эту опухоль от фиброаденомы молочной железы. В случае miR-342 обнаружение сниженной экспрессии этой микроРНК позволяет выделить устойчивые к терапии тамоксифеном опухоли молочной железы [15].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, очевидно, что в связи с упрощением методики, расширением спектра зондов и их совершенствованием, а также с появлением возможности количественной оценки результата исследования ГИС в ближайшее время будет активно использоваться в лабораторной практике лечебно-профилактических и научно-исследовательских учреждений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Херрингтон С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. / Херрингтон С., Макги Дж. – Москва : Издательство “Мир”, 1999. – 558 с.
- 2.Cassidy A. Developments in in situ hybridisation. / A. Cassidy, J. Jones // *Methods*. – 2014. – Vol. 70, №1. - P. 39-45.
- 3.Sahnane N. EGFR and KRAS Mutations in ALK-Positive lung adenocarcinomas: biological and clinical Effect. / N. Sahnane [et al.] // *Clin Lung Cancer*. - 2015.
- 4.Yoon H.I. Overexpression of SOX2 is associated with better overall survival in squamous cell lung cancer patients treated with adjuvant radiotherapy. / H.I. Yoon [et al.] // *Cancer Res Treat*. – 2015.
- 5.Мальков П.Г. Прижизненная морфологическая диагностика и эффективность использования ресурсной базы практической патологической анатомии. / П.Г. Мальков // Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины. Москва.- 2012.
- 6.Akiba J. Evaluation of immunohistochemistry using two different antibodies and procedures for primary lung adenocarcinoma harboring anaplastic lymphoma kinase rearrangement / J. Akiba [et al.] // *Oncology Letters*.- 2014.- Vol. 8, №5. – P. 2155-2159.

7. Mayr D. Chromogenic in situ hybridization for Her-2/neu-oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization / D. Mayr [et al.] // *Histopathology*. -2009.- Vol. 55, № 6. – P. 716-723.
8. Франк Г.А. Рак молочной железы. Руководство для врачей / Г.А Франк, Л.Э. Завалишина, К.М. Пожариский.- Москва: Издательский дом “Практическая медицина”, 2014.- 176 с.
9. Donnem T. Independent and tissue-specific prognostic impact of miR-126 in nonsmall cell lung cancer: coexpression with vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival / T. Donnem [et al.] // *Cancer*. - 2011. - Vol. 117, №14. - P. 3193-200.
10. Nielsen B.S. High levels of microRNA-21 in the stroma of colorectal cancers predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients / B.S. Nielsen [et al.] // *Clin Exp Metastasis*. - 2011. - Vol. 28, № 1. - P. 27-38.
11. Fassina A. Epithelial-mesenchymal transition in malignant mesothelioma / A. Fassina [et al.] // *Mod Pathol*. – 2012. – Vol. 25, №1. P. 86-99.
12. Rossi E. The evaluation of miRNAs panel on liquid based cytology of thyroid lesions: The role of miR-375 in follicular lesions. / E. Rossi [et al.] // *Virchows Arch*. – 2015. - Vol. 467, Suppl 1. P. 8-9.
13. Cappellesso R. Programmed cell death 4 nuclear loss and miR-21 overexpression in malignant mesothelioma / R. Cappellesso, L. Nicole, V. Guzzardo, A. Fassina // *Virchows Arch*. – 2015. - Vol. 467, Suppl 1. P. 43-44.
14. Suh K.S. MicroRNA expression profiles in phyllodes tumour and fibroadenoma of the breast. K.S. Suh, S.Y. Choi, M.R. Kim // *Virchows Arch*. – 2015. - Vol. 467, Suppl 1. P. 51.
15. Citlely D.M. Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors. / D.M. Citlely [et al.] // *Mol Cancer*. – 2010. – Vol. 20, № 9. P. 317.

ООО “Микротесты в биологии, медицине и ветеринарии”  
Суркова Екатерина Ивановна, руководитель проектов  
Ekaterina.Surkova@microtesty.ru

Тел.: +7 (917) 574-3056

ООО “Микротесты в биологии, медицине и ветеринарии”  
Сурков Константин Викторович, главный специалист по  
биотехнологиям

[k.surkov@microtesty.ru](mailto:k.surkov@microtesty.ru)

Тел.: +7 (985) 440-1161

ООО “Микротесты в биологии, медицине и ветеринарии”

Елагина Марина Ивановна, генеральный директор

[info@microtesty.ru](mailto:info@microtesty.ru)

Тел.: +7 (495) 969-9826

# **ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАБОТОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА**

**Тагирова М.К.<sup>1</sup>, Бяхова М.М.<sup>2</sup>, Богданова О.В.<sup>1</sup>**

*1 Московский Научно-Практический Центр*

*2 ФГБУ НИИ Экологии человека и гигиены окружающей среды им  
А.Н. Сысина Минздрава России, Москва*

Атопический дерматит (АД) — представляет собой заболевание, ассоциированное с хроническим воспалением кожи. АД возникает в результате генетической предрасположенности и влияния факторов окружающей среды. Генетическая диагностика АД заключается в поиске мутаций в гене FLG, который кодирует белок филагрин, участвующий в формировании защитного барьера кожи. Известно, что с АД ассоциированы гены SPINK5, FLG-2, SRR3, CLDN1, кодирующие белки участвующие в эпидермальном барьере кожи (Liang Y. et al., 2015). Понимание как работает иммунная система при нарушении защитного барьера кожи больных с АД остается актуальным.

В данной работе был проведен анализ экспрессии 500 генов, ассоциированных с работой иммунной системы, в периферической крови у больных детей с атопическим дерматитом разной тяжести (классический АД, тяжелая форма АД) без генетического тестирования на наличие мутации в гене FLG и контрольной группы. Экспрессия генов была определена с помощью технологии Nanostring Technologies®, которая позволяет напрямую детектировать молекулы РНК и поводить их количественный анализ. Результаты данных экспрессии 500 генов были



нормализованы с помощью профиля экспрессии 15 референсных генов (ABCF1, ALAS1, EEF1G, G6PD, GAPDH, GUSB, HPRT1, OAZ1, POLR1B, POLR2A, PPIA, SDHA, TBP, TUBB, RPL19) и статистически обработаны с использованием программы nSolver Nanostring. По оригинальным экспериментальным данным была выявлена статистически значимая повышенная экспрессия 141 генов у детей с тяжелой формой АД, и 65 генов у детей с классической формой АД из 500 генов, взятых для анализа работы иммунной системы, в сравнение с контрольной группой. Для двух форм (классический АД и тяжелая форма АД) была выявлена общая повышенная экспрессия 12 генов (гены CLEC5A, PML, GBP5, CD274, CAMP, EGR2, CCL3, BATF3, CFD, FAS, CXCL12, PDCD1LG2). Наш биоинформатический анализ генов с использованием публичных баз данных NCBI gene, GeneMapia показал, что при тяжелой форме АД запускается работа других генных сетей, в отличие от классической формы АД, где работают генные сети врожденного, адаптивного иммунитета и воспаления. При тяжелой форме АД повышается экспрессия генов, кодирующих транскрипционные факторы (гены STAT3, STAT2, STAT1), участвующие в инициации экспрессии генов разных генных сетей, а также генов, участвующих в процессах апоптоза (гены CASP8, CASP1). Только два гена имели разный статус экспрессии при разных формах АД. При классической форме АД ген IKBKE, кодирующий киназу, запускающую антивирусную сигнальную генную сеть, и ген NFATC2, кодирующий белок активирующий Т-клетки имели статистически значимую пониженную экспрессию, тогда как при тяжелой форме АД их экспрессия повышалась, что свидетельствует о чувствительности к вирусам больных с тяжелой формой АД.

Понимание работы иммунной системы при разных стадиях атопического дерматита может быть полезным при назначении гормональных кремов и контроля лечения, для молекулярно-генетической диагностики и таргетной терапии в будущем.

# **МИРОВ – БАЗА ДАННЫХ ПО НЕКОДИРУЮЩИМ РНК И КОМПЛЕКСНЫЙ ИНСТРУМЕНТ АНАЛИЗА И ВИЗУАЛИЗАЦИИ ГЕННЫХ СЕТЕЙ.**

**Фокин А.В., Поярков С.В., Иванков М.Ю., Сорокина С.Ю.,  
Купцов В.Н., Куликов А.М.**

*ИБР РАН им.Н.К.Кольцова, Москва, Россия; РНИМУ им. Н.И.  
Пирогова, Москва, Россия*

В 90-х годах прошлого века были описаны новые регуляторные молекулы – некодирующие РНК. После завершения дорогостоящего и, скажем прямо, несколько пафосного, международного проекта по полному прочтению генома человека исследователи сосредоточились на мутационных изменениях в кодирующей части генома, то есть в конкретных генах, кодирующих конкретные белки. В то время мутационная теория канцерогенеза заняла лидирующую позицию. Однако, последующее развитие высоких технологий открыло эпоху постгеномики, включающей в себя такие новые области знаний, как протеомика, эпигеномика, метаболомика. В результате исследований в этих областях были раскрыты механизмы действия различных типов некодирующих РНК (нкРНК) в жизнедеятельности клетки в норме и при патологии.

В настоящее время наибольший интерес с точки зрения изучения онкологических заболеваний представляют собой микроРНК. Впервые они открыты в 1993 году. В 2002 году показана роль микроРНК miR-15a и miR-16-1 в развитии B-клеточной хронической лимфоцитарной лейкемии. Исходя из роли микроРНК в опухолевых процессах их можно разделить на онкогенные микроРНК и онкосупрессорные микроРНК. Наиболее исследованной микроРНК, участвующей в развитии опухолевых процессов - miR-21. Экспрессия miR-21 часто повышена в опухолях различных типов и ассоциирована

с прогрессией, негативным прогнозом и устойчивостью к химиотерапии. Повышенная экспрессия miR-155 ассоциирована с негативным прогнозом при опухолях различной локализации, лимфом, вирусных инфекциях и кардиоваскулярных заболеваниях. Семейство микроРНК miR-200 участвует в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), метастазирования, экспрессия этих микроРНК подавлена во многих типах рака. Определение профиля экспрессии микроРНК данного семейства свидетельствует об инвазии, метастазах и может использоваться как прогностические маркеры. MiR-143/145 – онкосупрессорные микроРНК. Они ингибируют инвазию, миграцию и метастазирование, их экспрессия подавлена в колоректальном раке.

МикроРНК обладают рядом свойств, таких как высокая стабильность в биологическом материале, в том числе и в архивном материале, что позволяет их рассматривать как удобные биомаркеры. Анализ и сравнение архивных данных, полученных до лечения, с данными из вторичных очагов, метастазов или циркулирующих раковых клеток в процессе лечения и после, позволяют увидеть картину ответа опухоли на терапию и в случае неэффективности скорректировать ее.

Анализ генов-мишеней и их сопоставление с транскрипционными факторами позволяет отчасти сказать, какие пути могут с определенной долей вероятности привести к наблюдаемым изменениям, но результат анализа дает очень сложную картину генетических взаимодействий, имеющую невысокую вероятность точного прогноза. По результатам анализа профиля экспрессии микроРНК можно предсказать более точно те последствия или те явления, которые лежат в основе терапии тем или иным препаратом, причем не разбивая сложные взаимодействия модулей на бесконечно количество возможных исходов.

### **Цель и задачи:**

Цель: предоставить научно-исследовательским и медицинским

организациям новые и эффективные методы и средства проведения исследований в области персонализированной медицины.

**Задачи:** разработать диагностическую платформу анализа экспериментальных и клинических данных в контексте генных сигнальных сетей, общедоступную в сети Интернет, позволяющую сократить затраты на поиск мишеней терапевтического воздействия с учетом индивидуальных особенностей пациента и ускорить внедрение подходов персонализированной медицины в современную медицинскую практику.

### **Материалы и методы.**

В качестве системы управления базой данных используется MySQL, а также документно-ориентированная система управления базами данных MongoDB. Для анализа поступающих данных используются как существующие классические, так и авторские алгоритмы. Существующие алгоритмы написаны на нескольких языках: ruby, php, javascript и perl. Для визуализации данных используется графический пакет Cytoscape Web/Cytoscape.js, графический фреймворк AngularJS и javascript библиотека d3js.

Поиск, формализацию и внесение основных данных о молекулярно-генетических взаимодействиях вручную осуществили профессиональные биологи-аналитики. Часть данных вносится автоматически: для этого нашей командой были созданы специальные инструменты синтаксического анализа данных и их дальнейшей интеграции в разрабатываемый инструмент.

### **Основные результаты.**

Создаваемый информационный ресурс – MirOB общедоступен в сети Интернет и позволяет анализировать поступающие данные и визуализировать их в виде генной сети, включающей детально проаннотированные взаимодействия микроРНК, транскрипционных факторов и других молекулярно-генетических

агентов. Ресурс позволяет выявлять драйверные гены, связанные с развитием патологии и/или поддержания устойчивого патологического состояния, сопоставлять полученную генную сеть с индивидуальным генетическим профилем пациента, определять возможные лекарственные воздействия на целевые узлы данной сети и выбрать наиболее эффективные средства. Алгоритмы анализа предоставляют возможность поиска кратчайших расстояний между объектами сети, разделения сети на отдельные модули, связанные минимальными латеральными взаимодействиями, оценки состава объектов сети по онтологии клеточных процессов, функциональной активности генов, связи их с заболеваниями.

### **Заключение/выводы.**

Созданный инструмент может быть использован для подбора персонализированных препаратов и определения оптимальных схем лечения. Что позволит сократить временные затраты для поиска схем лечения для индивидуального пациента, а также увеличить вероятность подбора правильных персонализированных препаратов и определения оптимальных схем лечения.

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СПЛАЙСОСОМНЫХ БЕЛКОВ TRAP150 И BCLAF1 В КАЧЕСТВЕ РЕЦЕПТОРОВ УБИКВИТИНА

**Чернорудский А.Л.**

*ГБОУ ВПО “Нижегородская Государственная медицинская академия”*

Убиквитилирование – пост-трансляционная модификация белков, регулирующая большое число клеточных процессов как в норме, так и при патологических состояниях [1]. Присоединение к белку-мишени небольшого белка убиквитина в различных формах создает специфический сигнал, который распознается убиквитин-связывающими белками, которые затем преобразуют «убиквитиновый сигнал» в клеточную функцию. Несмотря на активные исследования в этой области, к настоящему времени остается неясным, как функциональная специфичность распознавания убиквитинового сигнала реализуется *in vivo*. Целью представленной работы было идентифицировать и охарактеризовать белки, специфически распознающие определенные типы убиквитиновой модификации и служащие убиквитиновыми рецепторами в клеточных сигнальных каскадах. Ранее нами была разработана и применена эффективная методика выделения убиквитин-связывающих белков с использованием в качестве зонда коротких линейных полиубиквитиновых цепей, с последующей идентификацией методом LC-MS/MS [2]. Для большей части идентифицированных в результате протеомного скрининга белков взаимодействие с убиквитином было показано нами впервые. Полученные результаты показали, что роль убиквитина в клеточном метаболизме шире и разнообразнее, чем было принято считать. В частности, идентифицированные нами белки TRAP150 и BCLAF1 являются компонентами сплайсосомы и принимают участие в процессах созревания и сплайсинга пре-мРНК, распада мРНК, а также в регуляции

апоптоза и клеточного ответа на повреждения ДНК [3; 4]. Так как потенциальная роль убиквитин-зависимого сигналинга в метаболизме РНК в литературе описана слабо, валидация и характеристика этих белков в качестве убиквитиновых рецепторов стала приоритетным направлением развития данного исследования.

Нами была проведена оптимизация сверхэкспрессии данных белков в виде конструкций с эпитопным гемагглютининовым тэгом НА в культуре клеток HeLa, что позволило в дальнейшем использовать антитела к НА для визуализации взаимодействий с помощью метода GST pulldown. В результате установлено, что оба белка специфически взаимодействуют с моноубиквитином, не связываясь при этом с линейными убиквитиновыми полимерами. Установлено, что при одновременной сверхэкспрессии рассматриваемых белков в клеточной культуре наблюдается повышенное связывание с убиквитином (рис. 1). Эти данные указывают, что белки TRAP150 и BCLAF1 могут быть компонентами одного функционального комплекса.

Для преципитации белков из лизата использовались агарозные конъюгаты с GST и GST-убиквитином (в виде мономера, димера и тримера убиквитина) в эквимолярной концентрации.

На верхней панели представлены результаты иммуноблоттинга с антителами к НА, на нижней – окраска соответствующих мембран Ponceau S. EV – трансфекция вектором, кодирующим только тэг НА.

С целью поиска ранее неизвестных убиквитин-связывающих доменов нами была проанализирована структура белков TRAP150 и BCLAF1 с помощью комплекса программных средств. В результате было установлено, что белки TRAP150 и BCLAF1 являются в большой степени неупорядоченными (по данным разных алгоритмов предсказания, до 90% аминокислотной последовательности представлено неупорядоченными регионами). Этот факт препятствует успешному предсказанию и моделированию пространственной структуры белка с

использованием существующих алгоритмов. Установлено, что проанализированные белки демонстрируют высокую степень гомологии, особенно в N-концевой области, которая содержит большое число серин-аргининовых повторов и отвечает за связывание молекул РНК. Также установлено, что потенциальные глобулярные домены белка TRAP150 (включая новый убиквитин-связывающий домен или домены) могут находиться в областях, ограниченных аминокислотными остатками 410-500, 560-694 и 712-808.

Таким образом, нам удалось идентифицировать новые убиквитин-связывающие белки, а также частично охарактеризовать специфичность распознавания ими убиквитинового сигнала. Функциональная роль идентифицированных убиквитиновых рецепторов указывает на потенциальное участие системы убиквитина в регуляции сплайсинга РНК. Хотя результаты отдельных исследователей свидетельствуют, что система убиквитина участвует в регуляции сборки и функционирования сплайсосомы [5; 6], механизмы, лежащие в основе этой регуляции, остаются фактически неизученными. Конкретные белки-эффекторы (убиквитиновые рецепторы, ферменты и субстраты убиквителирования), вовлеченные в эти процессы, также либо слабо изучены, либо вообще до сих пор неизвестны. Полученные нами результаты способствуют решению этой важной фундаментальной проблемы и позволяют в перспективе понять, как реализуется убиквитин-зависимая регуляция сплайсинга РНК на уровне молекулярных механизмов.

#### Литература:

1. Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta*. 2004. 1695(1-3):3-17.
2. Chernorudskiy A. Proteomic study of linear polyubiquitin chains interactome. *FEBS Journal*. 2013. 280(Suppl.1):269.
3. Lee KM, Hsu IaW, Tarn WY. TRAP150 activates pre-mRNA splicing and promotes nuclear mRNA degradation. *Nucleic Acids Res*.



2010. 38(10):3340-50.

4. Sarras H, Alizadeh Azami S, McPherson JP. In search of a function for BCLAF1. *ScientificWorldJournal*. 2010. 10:1450-61.

5. Bellare P, Small EC, Huang X, Wohlschlegel JA, Staley JP, Sontheimer EJ. A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway. *Nat Struct Mol Biol*. 2008. 15(5):444-51.

6. Pelisch F, Risso G, Srebrow A. RNA metabolism and ubiquitin/ubiquitin-like modifications collide. *Brief Funct Genomics*. 2013. 12(1):66-71.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 12-04-32136 и 15-04-02534).

# МИКРОРНК В КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Шубин В. П.

*Федеральное Государственное бюджетное учреждение  
«Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н.  
Рыжих» министерства здравоохранения Российской Федерации*

Колоректальный рак занимает лидирующие позиции в структуре как заболеваемости, так и смертности среди всех онкологических заболеваний в России и во всем мире. Ежегодно диагностируют около 1,2 миллионов новых случаев колоректального рака, и смертность составляет более 600 000 случаев. Колоректальный рак до поздних стадий практически протекает бессимптомно. Необходимость повышения эффективности ранней диагностики рака толстой кишки является весьма актуальной задачей во всем мире.

Одним из современных подходов в диагностике заболевания и его рецидива является определение профиля экспрессии микроРНК (miR) в плазме крови. Определение паттерна экспрессии микроРНК в самой опухоли может позволить выявлять наиболее злокачественные склонные к метастазированию раки. МикроРНК – малые некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, вызывая деградацию мРНК-мишеней или нарушение трансляции. Многие микроРНК вовлечены в процесс канцерогенеза и могут функционировать как онкогены или супрессоры опухоли. Изучение микроРНК в плазме крови дает возможность использовать их в качестве потенциальных биомаркёров для ранней диагностики. и принимают участие в процессах созревания