



Санкт-Петербургский
государственный
университет



**5-ая ежегодная конференция
Института Трансляционной Биомедицины
СПбГУ (ИТБМ СПбГУ)
«Актуальные проблемы трансляционной
биомедицины - 2019»**

Сборник тезисов



ЭКО
БЕЗОПАСНОСТЬ
НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР

ACCELLENA
R E S E A R C H



Частота встречаемости мутаций в гене АТР7В в российской популяции

Алавердян Д.А.¹, Федяков М.А.¹, Полев Д.Е.², Барбитов Ю.А.², Шиков А.Е.^{1,2}, Глотов А.С.^{1,2,5}, Романова О.В.¹, Цай В.В.¹, Калинин Р.С.¹, Балашова М.С.^{3,4}, Тулузановская И.Г.³, Иващенко Т.Э.⁵, Баранов В.С.^{1,2}, Филимонов М.И.³, Жученко Н.А.³, Игнатова Т.М.^{6,7}, Асанов А.И.³, Щербак С.Г.^{1,2}, Сарана А.М.^{1,2}, Уразов С.П.¹, Макаренко С.В.¹, Глотов О.С.^{1,2,5}

¹ СПбГБУЗ Городская больница №40, г. Санкт-Петербург, г. Сестрорецк, ул. Борисова, д.9

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д.7/9

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4

⁴ Центр Генетики и Репродуктивной Медицины «Genetico», г. Москва, ул. Губкина, д. 3 к. 1

⁵ ФГБНУ "НИИ Акушерства, Гинекологии и Репродуктологии им. Д.О. Отта", г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.31

⁶ ФГБУ ГНЦ РФ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23

⁷ Центр литотрипсии и эндохирургии (ЦЭЛТ), г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 62

Ключевые слова: редкие болезни, секвенирование, болезнь Вильсона-Коновалова

Введение. Болезнь Вильсона-Коновалова, или гепатоцеребеллярная дегенерация – аутосомно- рецессивное моногенное генетическое заболевание, возникающее вследствие мутаций гена АТР7В. Этот ген кодирует белок-транспортер меди АТФ-азу 7В, который ответственен за распределение меди, поступающей в гепатоциты. Считается, что распространенность БВК составляет примерно 1:30 000, однако в последние годы представления о частоте этого заболевания заметно меняются. Современные эпидемиологические исследования в различных странах Европы позволяют предполагать частоту БВК 1:7000-10 000, что существенно выше, чем та, о которой говорилось ранее.

Цель. Цель данного исследования – оценить популяционную частоту мутаций в гене АТР7В в российской популяции.

Материалы и методы. Было проведено высокопроизводительное секвенирование (NGS) образцов ДНК 697 человек без БВК. Секвенирование проводилось на платформе MiSeq/HiSeq 4000 Sequencing System (“Illumina”) с



использованием наборов пробоподготовки KAPA Library Preparation Kit и SeqCap Adapter Kit ("Roche"). Для интерпретации полученных данных использовались критерии, предложенные в руководстве по интерпретации данных, полученных методами MPS (Massive Parallel Sequencing). Корректировка вариантов проводилась с учетом возможных ошибок в базах данных, описанных нами ранее. Выявленные варианты классифицировались как патогенные, вероятно патогенные, неопределенного значения, вероятно доброкачественные и доброкачественные. Кроме этого, использовалась база данных мутаций гена ATR7B Университета Альберты (<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/>). Вариант рассматривался как патогенный, если обнаруживалась соответствующая информация о нем в различных базах данных и литературных источниках.

Результаты и обсуждение. У 20 из 697 обследованных были выявлены мутации гена ATR7B. Миссенс-мутация ATR7B с.3207C>A (p.His1069Gln, rs76151636, A = 0.1524%) в гетерозиготном состоянии была найдена у семи пациентов и в гомозиготном – у двух, то есть частота мутантной аллели составила 0,789%. Мутация со сдвигом рамки считывания ATR7B с.3402delC (p.Ala1135fs, rs187200982, delC = 0.01322%) в гетерозиготном состоянии была обнаружена у 11 пациентов, таким образом, частота делеции – 0,789%. Частота выявляемости патогенных мутаций в нашей группе выше, чем описано в литературе, и составляет 0,789% или 1/64. Высокая выявляемость может быть связана как с особенностями нашей группы, так и с использованным биоинформатическим подходом.

Заключение. Прогнозируемая частота носительства патогенных вариантов в российской популяции, таким образом, составила 1:4000, что значительно выше описанной в литературе.



hnRNP-K - маркер открытого хроматина в эмбриональных стволовых клетках мышцы

Бахмет Е.И.¹, Назаров И.Б.¹, Газизова А.Р.¹, Воробьёва Н.Е.², Кузьмин А.А.¹,
Гордеев, М.Н.¹, Синенко С.А.¹, Аксёнов Н.Д.¹, Артамонова Т.О.³,
Ходорковский М.А.³, Аленина Н.⁴, Онищук Д.⁵, Ву Г.⁶, Шолер Г.Р.⁶, Томилин
А.Н.¹⁷

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт Биологии Гена РАН, Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Центр Молекулярной Медицины им. Макса Дельбрюка, Берлин, Германия

⁵ Университет Фрайбурга, Фрайбург, Германия

⁶ Институт Молекулярной Биомедицины им. Макса Планка, Мюнстер, Германия

⁷ Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Плюрипотентные стволовые клетки отличаются своей способностью к самообновлению и к дифференцировке в любой тип соматических клеток. Ключевым транскрипционным фактором таких клеток является Oct4. Его ген *Pou5f1* подвержен сложной регуляции и имеет три регуляторных области – промотор, проксимальный энхансер и дистальный энхансер. Нами было показано, что *in vitro* и *in vivo*, со специфическими полиЦ-последовательностями энхансеров (сайты 2A и 1A соответственно) этого гена связывается представитель КН-доменных полиЦ-связывающих белков hnRNP-K. Оказалось неожиданным, что нокаут или нокадаун hnRNP-K в эмбриональных стволовых клетках мышцы и в эмбрионах не влияют ни на запуск, ни на поддержание экспрессии, ни на выключение Oct4. При этом нокаут hnRNP-K как в плюрипотентных, так и в дифференцированных клетках приводил к их гибели. Интересным фактом оказалась невозможность оверэкспрессии hnRNP-K в ЭСК мышцы, что вероятно указывает на наличие авторегуляторной петли. Хроматин-иммунопреципитация с использованием антител к hnRNP-K с последующим секвенированием ДНК (ChIP-seq) выявила наличие около 5000 сайтов связывания этого белка в геноме ЭСК. Сайты связывания hnRNP-K обнаружили рядом с такими генами, как *Pou5f1*, *Nanog*, *Zfp42* (Rex1), *Esrrb*, *Tbx3*, *Klf2*, *Otx2* и *Dnmt3b*. В ходе последующего биоинформатического анализа были выявлены колокализации hnRNP-K с белками Oct4, TBP, Otx2, а также с метками активного хроматина, такими как H3K27ac и с открытым хроматином (данные ATAC-seq). При этом было отмечено полное отсутствие колокализаций hnRNP-K с репрессирующими метками (H3K9me3) и с закрытым хроматином (данные MNase-seq). Таким образом, нами был сделан вывод о том, что hnRNP-K является маркером открытого хроматина в эмбриональных



Санкт-Петербургский
государственный
университет



стволовых клетках мышцы. В дальнейшем мы планируем узнать, является ли он причиной или следствием такого состояния хроматина.



Разработка генно-модифицированной клеточно-инженерной конструкции для замещения поверхностных дефектов гиалинового хряща

**Божокин М.С.^{1*}, Божкова С.А.¹, Качкин Д.В.², Рубель А.А.², Сопова Ю.В.²,
Нащекина Ю.А.³**

¹РНИИТО им. Р.Р.Вредена, Россия Санкт-Петербург, 195427

²Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург 199034

³Институт цитологии Российской Академии Наук. Россия. Санкт-Петербург, 194064

*writeback@mail.ru

Регенеративная способность гиалинового хряща крайне мала. Возникающие в дефекты суставной поверхности приводят к дальнейшей деградациии неповреждённого гиалинового хряща. В настоящее время данная проблема является чрезвычайно актуальной и затрагивает миллионы людей по всему миру. Несмотря на большое количество разработанных клинических методик по его восстановлению данная задача в полном объёме не решена до сих пор.

Одним из перспективных направлений является трансплантация на место дефекта суставного хряща культуры предварительно модифицированных аутологичных клеток (ММСК, хондроциты и др.) с увеличенным синтезом белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща в составе биodeградируемого матрикса (scaffold), образующих клеточно-инженерную конструкцию. Успешное применение такого объекта зависит от эффективной и безопасной методики генетической модификации клеточной культуры.

Целью исследования – являлось создание культуры трансфецированных ММСК предварительно разработанными плазмидами и совмещение их с биodeградируемым носителем на основе полимолочной кислоты.

Биodeградируемый матрикс был создан из полимолочной кислоты методом лиофильной сушки с добавлением коллагена. В качестве культуры клеток использовали мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (ММСК) выделенные у крыс, что было подтверждено цитофлуориметрически.

Было показано, что в присутствии белков Tgf β 3 и Sox9 в клеточной культуре происходит увеличение синтеза основных белков внеклеточного матрикса гиалинового хряща (коллаген II, агрекан), что согласуется с литературными данными. Нами были сконструированы две плазмиды несущие гены *tgfb3* и *sox9* на основе вектора pEGFP-N3. С их помощью культура ММСК трансфецировалась методом электропорации. Генно-модифицированную культуру удалось совместить с



биodeградируемый носителем динамическим способом с помощью специально созданного и запатентованного устройства (Ru 2019 104 311), получив, таким образом, генно-модифицированную клеточно-инженерную конструкцию.

Полученная аутологичная клеточно-инженерный конструкция с генетическими изменёнными характеристиками культуры клеток является перспективным для замещения поверхностных дефектов гиалинового хряща.



Реакция на новизну у крыс нокаутных по гену переносчика обратного захвата дофамина при выработке инструментальной двигательной реакции.

Вольнова А.Б.^{1,2}, Курзина Н.П.², Аристова И.Ю.¹, Гайнетдинов Р.Р.²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет,

² Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербург, Россия.

В настоящее время создание линий животных, нокаутных по определенному гену является перспективным направлением исследований, позволяющим выявить механизмы различного рода заболеваний. Такие модели позволяют так же осуществлять поиск лекарственных для лечения и предотвращения этих патологий. Линия крыс, нокаутных по гену, кодирующему переносчик обратного захвата дофамина (DAT-KO), и демонстрирующих повышенное содержание дофамина в тканях мозга является удобной моделью для исследования этиологии различных неврологических заболеваний и, в частности, синдрома дефицита внимания (1). Было показано, что для DAT-KO крыс характерны значительное повышение локомоторной активности и снижение спонтанной альтернации в У-образном лабиринте (1).

Кроме того, недавно было выявлено, что крысы линии DAT-KO демонстрируют определенный дефицит внимания при предъявлении новых объектов (2).

Целью данной работы было изучение влияния повышенного уровня дофамина у крыс линии DAT-KO на выработку инструментальной двигательной реакции при различении знакомых и незнакомых объектов.

Животных обучали совершать побегу к двум кубикам, расположенным над лунками с пищевым подкреплением в установке Red Box (адаптировано из работы Gilbert P.E., Kesner R.P. 2003). В качестве новых объектов использовали набор игрушек различной формы, пары которых которые не сопровождалась пищевым подкреплением. Каждый новый объект предъявлялся только один раз в течение всего хода обучения.

Было выявлено, что время, затрачиваемое на обследование незнакомых объектов, было достоверно больше времени обследования знакомых объектов в обеих группах крыс. В то же время крысы линии DAT-KO достоверно дольше обследовали новые объекты по сравнению с животными контрольной группы.

Характер двигательной активности у обеих групп животных так же отличался. У крыс линии DAT-KO имел место обход объектов и соприкосновение с ними всем



телом, тогда как крысы контрольной группы обследовали объекты главным образом при помощи вибрисс на голове и не совершали кругового обхода.

Количество ошибочных реакций (сдвигание нового объекта без пищевого подкрепления) было достоверно больше у контрольных животных, чем у DAT-KO крыс.

Полученные данные свидетельствуют о том, что крысы линии DAT-KO запоминают связь предъявления новых объектов с отсутствием пищевого подкрепления намного эффективнее, чем животные контрольной группы.

Кроме того, тактики, используемые для успешного выполнения поведенческой задачи контрольными животными и крысами линии DAT-KO, различаются.

Таким образом, полученные данные позволяют думать, что повышенный уровень дофамина, вызывая дефицит внимания, приводит к использованию нокаутными животными дополнительного сенсорного притока для успешного решения поведенческой задачи. Тот факт, что они более стабильно выполняют эту задачу может быть отражением присущей нокаутным животным стереотипии в реализации поведенческих реакций.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-30008.



***De novo* секвенирование белков с использованием гибридных методов активации ионов.**

К.В. Вяткина^{1,2}, W. Liu³, J. Shaw³

¹ Институт трансляционной биомедицины СПбГУ;

² Лаборатория биоинформатики и математической биологии, СПбАУ РАН;

³ Pacific Northwest National Laboratory, WA, USA

На сегодняшний день масс-спектрометрия представляет собой наиболее эффективный и часто применяемый способ исследования первичной структуры белка. В последние годы все большую популярность приобретает подход «сверху вниз» (top-down), позволяющий анализировать белковые молекулы целиком. В то же время, для масс-спектров «сверху вниз», полученных с использованием уже ставших традиционными методов CID/CAD, ETD/ECD или HCD активации ионов, характерна относительно невысокая степень покрытия аминокислотной последовательности белка, вследствие чего точное ее установление порой оказывается невозможным. С другой стороны, метод UVPD (ultraviolet photodissociation, ультрафиолетовая фотодиссоциация) с длиной волны 193 нм позволяет существенно улучшить покрытие, однако в полученных таким образом масс-спектрах одновременно присутствуют девять различных типов фрагментных ионов, что существенно затрудняет их интерпретацию. Таким образом, перспективным представляется подход к анализу белковых последовательностей по наборам масс-спектров, полученных с использованием различных методов активации ионов.

Целью данной работы являлась разработка алгоритма *de novo* секвенирования белков по наборам масс-спектров «сверху вниз», полученных при помощи метода UVPD с длиной волны 193 или 157 нм (во втором случае в масс-спектрах доминируют α - и χ -ионы) и метода ECD (в таких масс-спектрах доминируют c - и z -ионы). Предложенный метод осуществляет предварительную аннотацию пиков по типам ионов, выделяет группы пиков, потенциально соответствующих одному и тому же фрагменту белковой молекулы, и далее, следуя концепции алгоритма *de novo* секвенирования Twister (Vyatkina et al., 2015, 2016, 2017; Vyatkina, 2017), строит для них обобщенный спектральный граф и генерирует на его основе аккуратные фрагменты аминокислотной последовательности исследуемого белка. На заключительном этапе заполняются «пробелы» между восстановленными таким образом участками последовательности.

Тестовые наборы UVPD- и ECD-спектров были получены с использованием модифицированного масс-спектрометра Thermo Scientific Q Exactive HF и масс-



спектрометра Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos. Разработанный подход позволил восстановить полностью аминокислотную последовательность убиквитина (~8.6 кДа), а также приблизительно 78% последовательности миоглобина (~17.5 кДа). В рамках дальнейших исследований планируется усовершенствование алгоритма с целью обеспечения возможностей его применения для анализа модифицированных форм белков.



Роль различных участков белка Sup35 в формировании биомолекулярных конденсатов

Горшенева Н.А.¹, Гризель А.В.¹, Куличихин К. Ю.¹, Рубель А.А.¹ Чернов
Ю.О.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург 199034,

²Georgia Institute of Technology, USA, Atlanta, GA 30332-2000;

Natalia.Gorsheneva@mail.ru

Формирование биомолекулярных конденсатов (белковых немембранных обратимых агрегатов в цитоплазме клетки) является одним из видов стрессового ответа клетки. Биомолекулярные конденсаты формируются вследствие разделения жидких фаз, происходящего при незначительных изменениях физико-химических свойств среды (рН, осмотического давления). В их образовании принимают участие амилоидогенные домены белков, также известные способностью формировать необратимые амилоидные или прионные агрегаты, приводящие к наследуемым фенотипическим изменениям у дрожжей. У человека и других млекопитающих образование амилоидных агрегатов коррелирует с развитием нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на то, что амилоидные домены белков были описаны более 20 лет назад, их физиологические функции и регуляция агрегации в организме во многом остаются неясными. Удобной моделью для изучения свойств амилоидных доменов белков является дрожжевой белок Sup35 — фактор терминации трансляции, состоящий из 3 доменов: (1) прионного N домена, (2) M домена (по последним данным являющимся сенсором рН) и (3) функционального C домена.

Цель данной работы — исследование механизма влияния N и M доменов дрожжевого белка Sup35 на формирование биомолекулярных конденсатов в ответ на стрессовые воздействия. Для этого, мы исследовали образование биомолекулярных конденсатов под действием осмотического шока следующих вариантов белка Sup35: NM-YFP, NM(Δ 1-39)-YFP, NM(Δ 75-123)-YFP, NM(Δ 98-123)-YFP, Sup35N-YFP.

Было показано, что осмотический шок вызывает фазовый переход белка Sup35N/NM в биомолекулярные конденсаты, колокализующиеся с белком стресс-гранул Pub1. Данные биомолекулярные конденсаты являются «жидкими каплями», так как легко растворяются 1,6-гександиолом. Способность образовывать биомолекулярные конденсаты белком Sup35NM при осмотическом шоке закреплена эволюционно: белки Sup35NM из близко- и дальнородственных видов дрожжей переходят в биомолекулярные конденсаты под воздействием 1M KCl. M домен белка Sup35 сдерживает переход N домена в биомолекулярные конденсаты в нормальных



условиях (белок Sup35N-способен эффективно образовывать биомолекулярные конденсаты без стрессовых воздействий). Белки NM(Δ 1-39)-YFP, NM(Δ 75-123)-YFP не образуют бимолекулярные конденсаты под действием осмотического шока.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФ №18-74-00041 и при помощи ресурсных центров СПбГУ: «Биобанк», «Хромас» и «РМИКТ».



Трансляционные и эволюционные проблемы экспериментального моделирования отчаяния

Демин К.А.^{1,2}, Лакстыгал А.М.¹, Кротова Н.А.^{1,2}, Ильин Н.П.¹, Таранов А.С.¹,
Калуев А.В.^{1,2,3}

1 – Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

2 – Институт Экспериментальной Медицины, Национальный Медицинский Исследовательский центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

3 – School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing, China

Трансляционные модели животных и тесты широко используются в доклинической практике для изучения механизмов стресса и связанных с ним поведенческих фенотипов и биомаркеров. Одним из наиболее истощающих и распространенных заболеваний, связанных с стрессом, является депрессия, вклад которой в года, потерянные в результате нетрудоспособности в мире, составляет порядка 5% от общего вклада болезней. Несмотря на распространенность и вред, депрессия остается плохо изученным заболеванием и часто остается резистентной к лечению, носит рецидивирующий характер. Традиционно для изучения депрессии и поиска антидепрессантов использовались грызуны. В связи с выраженной гетерогенностью заболевания и трудностью трансляции наблюдаемых фенотипов между моделями и человеком, большая часть используемых тестов концентрируется на наблюдении за узким спектром эндофенотипов и поведенческих биомаркеров. Одним из наиболее популярных методов биоскрининга антидепрессантов на сегодняшний день являются тесты на поведение отчаяния – тест принудительного плавания Порсолт и тест подвешивания за хвост Стеру. Концептуально тесты основаны на идее помещения животного в неизбежную стрессовую ситуацию (как например, подвешивание) и оценке уровня его активности. Известно, что антидепрессанты (в том числе СИОЗ, трициклические антидепрессанты и ингибиторы МАО) склонны увеличивать активность грызунов в данном тесте. В тоже время, тесты обладают определенными ограничениями: например, многие стимуляторы дают ложноположительный результат в данном тесте. Также, увеличение поведения отчаяния (снижение активности) наблюдается далеко не во всех моделях депрессии, а лечение человека новыми антидепрессантами, предложенными в результате скрининга, оказывается не эффективным в 40% случаев. Остается неясным также почему тесты эффективны при остром, разовом воздействии антидепрессантов, хотя для развития антидепрессивных эффектов у человека требуются недели. Для изучения наиболее фундаментальных основ



поведения отчаяния у позвоночных, а также для существенного упрощения доклинического скрининга антидепрессантов нами были предложены методики для оценки поведения отчаяния у нового модельного организма в нейробиологии – *Danio rerio* (зебраданио). Зебраданио — это набирающий популярность модельный организм для исследования аффективных расстройств и поиска новых лекарственных средств, который демонстрирует характерные поведенческие и физиологические ответы на стресс и является высоко гомологичным по отношению к людям организмом в генетическом и физиологическом смысле. Здесь мы рассмотрим основные методики оценки отчаяния у *Danio rerio*, а также на основании результатов пилотных экспериментов, дадим первое концептуальное трансляционное сравнение эндотипа отчаяния между рыбами, грызунами и симптомами депрессии человека.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда №19-15-00053. Из средств гранта РФ были получены результаты концептуального сравнения эндотипов отчаяния между модельными организмами и человеком, а также произведено финансирование освещения результатов работы. Работа Демина КА поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований №18-34-00996, стипендией Президента РФ для студентов и аспирантов обучающихся по приоритетным направлениям и Специальной Ректорской стипендией для обучающихся в аспирантуре СПбГУ. Из средств гранта РФФИ и стипендиальных средств была произведена серия экспериментов на изучение отчаяния у *Danio rerio*.*



Исследование функций рецепторов следовых аминов на нокаутных животных.

Ефимова Е.В., Куварзин С.Р., Мор М.С., Гайнетдинов Р.Р.

Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт Трансляционной Биомедицины, СПбГУ

Система следовых аминов в последние несколько лет приобрела особый интерес в связи с открытием в мозге специфических рецепторов к следовым аминам. Из показанных на настоящий момент функций следовых аминов можно предположить, что они могут модулировать работу моноаминэргических систем головного мозга. Это позволяет рассматривать рецепторы следовых аминов как перспективные мишени для разработки новых лекарственных препаратов.

Всего у человека показано 6 типов рецепторов к следовым аминам (TAAR). При этом про функции многих из них имеется крайне мало информации. Мы провели оценку и сравнение параметров поведения и нейрохимии мозга у двух линий мышей - нокаутных по TAAR2 и TAAR6 рецепторам.

По параметрам поведения обе линии нокаутных животных не имели различий по уровню общей двигательной активности в тесте открытое поле. При этом параметры эмоционального поведения у двух этих линий мышей различались. Отсутствие TAAR2 рецептора приводило к снижению депрессивно-подобного поведения — у TAAR2 нокаутных мышей было достоверно снижено время иммобилизации в тесте неизбегаемого плавания по Порсольту по сравнению с мышами дикого типа. У TAAR6 нокаутных мышей в этом тесте не было выявлено различий по сравнению с мышами дикого типа. Но при этом в ряде тестов, включая тест крестообразных приподнятый лабиринт, наблюдалось снижение параметров тревожности.

Кроме различий в поведении, мы также обнаружили различия в профиле нейрохимии моноаминов головного мозга. У TAAR6 нокаутных мышей был повышен уровень серотонина в тканях коры головного мозга и гиппокампа по сравнению с уровнем у животных дикого типа. У TAAR2 нокаутных мышей изменений в уровне серотонина обнаружено не было, но у них был достоверно повышен уровень дофамина в стриатуме.

Полученные нами данные позволяют предположить, что несмотря на определенную однонаправленность функций рецепторов следовых аминов, каждый из типов рецепторов будет обладать своим уникальным спектром действия.

Работа поддержана грантом РФФ 19-75-30008



Разработка антибактериального препарата, эффективного в отношении антибиотикорезистентных бактерий

Зигангирова Н.А., Лубенец Н.Л.

ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ

Повсеместное распространение антибиотикорезистентных штаммов диктует необходимость разработки препаратов с альтернативным антибиотикам механизмом действия. Новый подход, который разрабатывается в ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ, заключается в снижении селективного давления на патогены и смене парадигмы лечения инфекций – лекарство должно не убивать бактерии, а подавлять вирулентность, что принципиально снизит риск развития резистентности. Коллективом авторов разработан оригинальный антибактериальный препарат на основе ингибитора ключевого фактора патогенности широкого круга грамотрицательных бактерий, секреторный аппарат III типа (ССТТ). Препарат прошел все стадии доклинической разработки, стартуя с поиска низкомолекулярных ингибиторов ССТТ; виртуального и экспериментального выбора «лидерного» соединения; изучения антибактериальной активности, токсичности и фармакокинетики. Разработанный препарат подавляет инфекционный процесс на моделях инфекции, вызванной псевдомонадами, сальмонеллами и хламидиями, вне зависимости от антибиотикорезистентности, не вызывает формирования устойчивости к нему и не подавляет нормальную микрофлору. Проведенные КИ I фазы препарата Фтортиазинон, таблетки, 300 мг, показали хороший профиль переносимости препарата при однократном и курсовом приеме. В 2018 г. завершена первая часть исследования КИ II фазы «Многоцентровое, рандомизированное, слепое, плацебо-контролируемое исследование безопасности и эффективности препарата Фтортиазинон, таблетки 300 мг, в комбинации с препаратом Цефепим, для внутривенного и внутримышечного введения, в сравнении с плацебо в комбинации с препаратом Цефепим, для внутривенного и внутримышечного введения, при лечении пациентов с осложненными инфекциями мочевыводящих путей, вызванными *P. aeruginosa*», в которой приняли участие 120 пациентов в 8 клинических центрах Санкт-Петербурга и Ленинградской области (гл. исследователи: Шуньков В.Б., Горелов Д.С., Матевосян Е.Н., Бушара М.О., Горелов А.И., Мангушло А.А.). Результаты по безопасности позволяют сделать заключение о его благоприятном профиле безопасности и переносимости. В отношении эффективности на данный момент можно обозначить наблюдаемую тенденцию лучшей эффективности в группе лечения Фтортиазиноном.



Анализ изменения экспрессии генов при действии убаина в культуре нейронов, полученных из ИПСК человека

Казанская Р.Б.¹, Лопачев А.В.^{2,5}, Лагарькова М.А.³, Логачева М.Д.⁴,
Гайнетдинов Р.Р.⁵, Федорова Т.Н.²

1 – Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

2 – Научный центр неврологии, Москва, Россия;

3 – НИИ физико-химической медицины, Москва, Россия;

4 – Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия;

5 – Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Известно, что Na,K-АТФаза функционально взаимодействует как с мембранными, так и цитоплазматическими белками в нейронах. Нарушение работы специфической для нейронов $\alpha 3$ субъединицы Na,K-АТФазы связано с развитием неврологических заболеваний. Кардиотонические стероиды (КТС), специфические ингибиторы Na,K-АТФазы, были обнаружены в организме млекопитающих и могут быть эндогенными регуляторами в центральной нервной системе (ЦНС). На данный момент нет полной картины, описывающей воздействие КТС на нервную систему. В данном исследовании была поставлена задача по выявлению групп генов, экспрессия которых изменяется при воздействии нетоксичных концентраций КТС убаина на культуру нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. Полный анализ экспрессии генов был проведен при помощи технологии RNAseq с последующей кластеризацией и распределением генов по GO группам. Было показано, что данная культура экспрессирует как облигатную $\alpha 1$, так и специфичную для нейронов $\alpha 3$ субъединицы Na,K-АТФазы. При инкубации культуры в течение 48 ч убаин в концентрации более 10 нМ вызывал уменьшение жизнеспособности культуры. Инкубация культуры с 10 нМ убаином в течение 16 часов вызывала увеличение более, чем в 2 раза экспрессии 968 генов и уменьшения более, чем в 2 раза экспрессии 990 генов. Проведенный при помощи базы данных KEGG анализ списка генов, экспрессия которых двукратно увеличилась, выявил ряд затрагиваемых ими физиологически и патофизиологически значимых процессов в нейронах, включая различные каскады: регуляция активности MAP-киназ (32 гена), RAS-зависимые сигнальные каскады (23 гена), HIF-1-связанные сигнальные каскады (16 генов), и TGF- бета зависимый сигнальный каскад (13 генов), различные патологии: болезнь Гентингтона (28 генов), болезнь Паркинсона (23 гена) и болезнь Альцгеймера (23



гена), а также некоторые другие процессы, включая окислительное фосфорилирование (24 гена), дофаминергический синапс (14 генов), и циркадные ритмы (7 генов). Аналогичный анализ групп генов, экспрессия которых уменьшилась, указывает на их участие в развитии ЦНС, в том числе нейрогенезе, нейрональной дифференцировке и развитии нейритов, а также развитию кокаиновой зависимости (9 генов) и болезни Паркинсона (16 генов).

Данное исследование выявило широкий спектр процессов в нейронах характерных как для нормальной, так и патологической физиологии ЦНС вызываемых уабаином.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-01321.



Как нейробиологические исследования на зебраданио меняют современную биологическую психиатрию

Калуев А.В.^{1,2,3}, Демин К.А.^{2,3}, Лакстыгал А.М.², Кротова Н.А.^{2,3}, Таранов А.С.²,
Ильин Н.П.²

1 – School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing, China

2 – Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

3 – Институт Экспериментальной Медицины, Национальный Медицинский Исследовательский центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Зебраданио (*Danio rerio*) – это новый и эффективный модельный организм для биомедицинских исследований. Данный организм обладает всеми основными рецепторами к нейротрансмиттерам, транспортерами и ферментами, а также выраженным поведенческим репертуаром, таким образом предоставляя широкие возможности для моделирования заболеваний ЦНС. Однако, наше понимание роли зебраданио в современных нейронауках все еще ограничено, что приводит к неполноценной реализации его основных преимуществ: 1) выраженности фенотипов, 2) простоты экспериментальных манипуляций и 3) высокопроизводительного потенциала. Сегодня, зебраданио используется для дополнения других моделей в исследованиях агрессии, социальных взаимодействий и аффективных состояний. В данной работе мы суммируем текущие наработки, сделанные с использованием организма, для определения генов, молекул и нейрональных путей, вовлеченных в поведение. *Danio rerio* обладают выраженной генетической гомологией по отношению к людям, с их геномом легко проводить манипуляции для дальнейшего исследования влияния генов на развитие и поведение организма. Модели на зебраданио сделали вклад в наше понимание эффектов психоактивных препаратов и способствовали разработке новых технологий визуализации мозга. В сумме, удобство генетических, фармакологических и поведенческих манипуляций на зебраданио обеспечивает возможность моделирования критически важных расстройств мозга. Мы подчеркиваем прогресс, сделанный с использованием зебраданио, и потенциал их использования в нейробиологии в целом. Таким образом, модели *Danio rerio* занимают жизненно необходимую нишу в сфере нейронаук и (при комбинировании с более изученными моделями грызунов и приматов) зебраданио позволяют получить более детальное представление о биологической природе поведения. Мы также представим основу для дальнейшего развития исследований на *Danio rerio* внутри трансляционных нейронаук с целью разработки новых методов лечения заболеваний мозга и углубления нашего понимания нервной системы.



*Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда №19-15-00053. Из средств гранта РФ были получены результаты экспериментальных поведенческих и молекулярных данных по хроническому стрессированию *Danio rerio*, а также обеспечено финансирование освещения результатов работы. Работа Демина КА поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований №18-34-00996, стипендией Президента РФ для студентов и аспирантов обучающихся по приоритетным направлениям и Специальной Ректорской стипендией для обучающихся в аспирантуре СПбГУ. Из средств гранта РФФИ и стипендиальных средств был произведен анализ литературы по проекту.*



«Создание 6-ОНДА модели паркинсонизма на TAAR5-нокаутных животных»

Католикова Н.В.¹, Ефимова Е.В.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹.

1 Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ

Болезнь Паркинсона (БП) является широко распространенным заболеванием среди людей, в возрасте старше 60 лет. В настоящее время не существует патогенетического лечения БП. Современное лечение БП только симптоматическое. Основная цель этого лечения - повышение уровня дофамина в стриатуме. На протяжении многих лет Леводопа остается основным препаратом для лечения БП. Леводопа содержит предшественник дофамина L-допа, который превращается в дофамин в окончаниях дофаминергических нейронов. L-допа очень эффективна в уменьшении клинических симптомов БП, но постоянное прогрессирование болезни требует постепенного увеличения дозы препарата, и, кроме того, использование L-допы приводит к развитию ряда побочных эффектов, основным из которых является дискинезия, вызванная L-допой (LID). Основными проявлениями LID являются неконтролируемые движения головы, мышц лица, конечностей, что вызывает дискомфорт и значительно снижает качество жизни пациентов. На данный момент причины и патогенез LID не совсем ясны.

Следовые амины (ТА) являются биологическими аминами, которые были известны в течение многих лет. Но рецепторы для ТА (TAAR) были открыты около 15 лет назад. Существует много типов TAAR, но у человека есть только 6 типов. Наиболее известным является TAAR1, и было показано, что активированный TAAR1 образует димеры с D2 дофаминергическими рецепторами и активирует сигнальные пути, общие с дофамином. Также было показано, что агонисты TAAR1 усугубляют дегенерацию, индуцированную 6-ОНДА у мышей WT, и субхроническое лечение L-DOPA 6-ОНДА модели паркинсонизма у мышей TAAR1-KO приводит к более выраженному вращению и дискинезии, чем у их аналогов дикого типа. Это показывает, что TAAR могут играть роль в дофаминергической передаче сигналов, прогрессировании ПД, а также в формировании LID.

Мы проанализировали мышей TAAR5-KO. Мы оценили экспрессию мРНК в различных областях мозга и показали спектр различий, в особенности мы обнаружили повышение уровня экспрессии рецепторов D1 в стриатуме. То же самое было показано для LID. В нашей работе мы создали модель 6-ОНДА для мышей TAAR5-KO и WT и проанализировали различия в образовании и степени тяжести LID.



Санкт-Петербургский
государственный
университет



Работа поддержана грантом РФФ 19-75-30008



Изучение амилоидных свойств белков pnc3 и rad51 *in vitro*

Качкин Д.В.^{1,*}, Аксенова А.Ю.¹, Хорольская Ю.И.³, Зелинский А.А.¹, Рубель А.А.¹, Чернов Ю.О.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9;

² School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Engineered Biosystems Building (EBB), M/C 2000, 950 Atlantic Drive, Atlanta, GA, USA

³ Федеральное государственное учреждение науки Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
*pspdaniel@mail.ru

Амилоиды – это высокоупорядоченные агрегаты белковой природы, способные присоединять к себе мономерные молекулы того же белка с изменением его нативной конформации. Амилоидные фибриллы обогащены β-слоями и устойчивы к действию протеиназ и детергентов. Интерес к амилоидам обусловлен в виду вызываемых ими неизлечимых заболеваний человека и животных.

С ростом количества работ, посвященных амилоидным белкам, стало понятно, что амилоиды могут выполнять и определенные функции в организме. Такие амилоиды называют функциональными, они были обнаружены в разных группах живых организмов – от бактерий до человека.

В ходе проведенных нами исследований были идентифицированы новые потенциально-амилоидные белки человека – Pnc3 и Rad51.

Белок Pnc3 является одним из ключевых компонентов поликомб группы (PCG) – комплекса необходимого для поддержания репрессивного состояния многих генов. Используя дрожжевую модель, мы показали, что короткие изоформы белка Pnc3 способны к амилоидной агрегации в дрожжах *S. cerevisiae*. Мы предполагаем, что агрегация коротких изоформ белка Pnc3 может вовлекать в амилоидогенез полноразмерную форму белка, контролируя таким образом уровень экспрессии ряда генов.

Rad51 – один из основных белков участвующих в репарации повреждений ДНК по механизму гомологичной рекомбинации. Мы полагаем, что Rad51 может формировать амилоидные агрегаты, в некоторых типах раковых клеток, влияя таким образом, на репарацию ДНК в раковых клетках.

Данная работа направлена на изучение амилоидных свойств белка Pnc3 на клеточных культурах человека HEK293. Изучение амилоидогенных свойств белка Rad51 проводится на дрожжевой модели, *in vitro*, в клеточных культурах, а также на тканевом материале пациентов больных онкологическими заболеваниями.



Санкт-Петербургский
государственный
университет



Данная работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 18-04-00799 и
РНФ 18-74-0004. Для исследований использовали приборную базу ресурсных центров
СПбГУ: «ЦКП ХРОМАС», «РМиКТ».



Новые методы быстрой оценки функции памяти у *Danio rerio*

Кротова Н.А.^{1,2}, Таранов А.С.², Ильин Н.П.², Лакстыгал А.М.², Демин К.А.^{1,2},
Калуев А.В.^{1,2,3}

1 – Институт Экспериментальной Медицины, Национальный Медицинский Исследовательский центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

2 – Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

3 – School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing, China

Несмотря на то, что большая часть тестов на память была успешно перенесена от грызунов к *Danio rerio*, подавляющее большинство из них предполагает длительное обучение. Те же тесты, которые направлены на быстрое исследование краткосрочной памяти, предполагают либо изучение механизмов пространственной ориентации (Y-maze), либо тестирование большого числа рыб и отсеивания малочувствительных к парадигме рыб в процессе. В данной работе мы поставили задачу предложить тесты для оценки функции памяти *Danio rerio*, при использовании которых можно было бы оценить эффект краткосрочного запоминания в течение суток с момента первого триала и сравнить их эффективность со стандартным тестом ингибирования избегания, проводимым ежедневно. В работе использовались взрослые короткохвостые *Danio rerio*, содержащиеся в стандартных лабораторных условиях. В Эксперименте 1 рыбы (N=34) помещались в белую половину незнакомого им черно-белого аквариума, разделенного пополам прозрачной перегородкой. После минуты акклиматизации открывалась и рыбе в течение 3 минут давалась возможность заплывать в черную половину. При заплывании в черную половину перегородка закрывалась, и рыба подвергалась действию низковольтного электрического тока (0.1 в/см воды) в течение 10 сек. После теста рыба помещалась назад в домашний аквариум. Если рыба не заплывала в черную половину, ее аккуратно загоняли туда сачком и проводили аналогичные манипуляции. Эксперимент повторялся каждый день в течении 4 дней. Каждый день оценивался латентный период заплыва в черную половину аквариума (сек). В Эксперименте 2 рыбы (N=15) подвергались такому же протоколу, как и в Эксперименте 1, но протокол повторялся трижды каждые 5 часов первого дня и в четвертый раз спустя сутки после последнего триала. Каждый триал оценивался латентный период заплыва в черную половину аквариума (сек). В Эксперименте 3 рыбы (n=16) помещались в количестве 8 штук в ту же белую половину черно-белого аквариума с включенным заранее током в черной половине аквариума на 8 часов первого дня, что предотвращало их попадание в черную половину – условное избегание места. Спустя сутки рыбы, подвергнутые обучению, и контрольные рыбы помещались индивидуально в данный аквариум и их



поведение в течение 5 минут записывалось. Было оценено время, проведенное в темной половине (сек), количество заплывов туда и латентный период до первого заплыва (сек). Данные оценивались при помощи теста Краскала-Уоллиса (KW-test) с постхок тестом Данна (D-test) для попарных сравнений или теста Манна-Уитни (U-test) и представлены как Mean±SEM. По результатам Эксперимента 1 было показано, что статистически значимое ингибирование избегания достигается на четвертый триал (9.79±2.25, 24.58±7.16, 45.48±11.16 и 66.55±12.38 сек. (1, 2, 3 и 4 триал соответственно), $p < 0.005$ KW-test, $p < 0.01$ 1 триал против 4 D-test). По результатам Эксперимента 2 статистически значимое ингибирование избегание наблюдалось уже на третий триал и оставалось таким и на второй день тестирования (21.20±11.75, 74.66±20.61, 105.31±19.07, 91.71±21.17 (1, 2, 3 и 4 триал соответственно), $p < 0.005$ KW-test, $p < 0.005$ 1 триал против 3 и $p < 0.05$ 1 триал против 4, D-test). В Эксперименте 3 наблюдалось статистически значимое снижение латентного периода заплыва в темную половину (32.94±12.52 и 129.43±27.18 сек (здесь и далее контроль против экспериментальной группы), $p < 0.005$, U-test), количества заплывов туда (16.25±1.26 и 6.43±2.08, $p < 0.005$, U-test) и времени проведенного там (197.19±10.26 и 24.51±8.43 сек, $p < 0.001$, U-test). Таким образом, можно предположить, что представленные в Эксперименте 2 и 3 тесты представляют собой более быстрые методы оценки краткосрочной памяти у *Danio rerio*, чем стандартный тест ингибирования избегания. Дальнейшее тестирование чувствительности предложенных парадигм по отношению к препаратам, стимулирующим память (ноотропы, например пирацетам) и снижающим эффективность памяти (например, скополамин), необходимо для отладки данных парадигм.

Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда №19-15-00053. Из средств гранта РФ были получены результаты Экспериментов 1-3, а также обеспечено финансирование освещения результатов работы. Работа Демина КА поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований №18-34-00996, стипендией Президента РФ для студентов и аспирантов обучающихся по приоритетным направлениям и Специальной Ректорской стипендией для обучающихся в аспирантуре СПбГУ. Из средств гранта РФФИ и стипендиальных средств был выполнен сбор и анализ литературы по проекту.



Исследования эффективности и безопасности применения различных лекарственных форм налтрексона для лечения синдрома зависимости от опиатов

Крупницкий Е.М.^{1,2,3}, Звартау Э.Э.², Блохина Е.А.², Лиознов Д.А., Вуди Д.³

¹ – ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М.Бехтерева,

192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 3

² – ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова», Институт фармакологии им. А.В.Вальдмана, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8

³ – Пенсильванский Университет, 19104, Филадельфия, Пенсильвания, США

В докладе будут представлены результаты исследований применения различных лекарственных форм конкурентного опиоидного антагониста налтрексона (пероральной, имплантируемой, инъекционной) для стабилизации ремиссии и предотвращения рецидива у больных с синдромом зависимости от опиоидов, выполненных авторами в течение последнего двадцатилетия. По данным исследований авторов депо-формы налтрексона (имплантируемые и инъекционные) являются более эффективными, чем пероральные, т.к. позволяют отчасти решить проблему комплаенса, возникающую при приеме пероральной формы. Лекарственные формы налтрексона пролонгированного действия характеризуются хорошей переносимостью и открывают новые перспективы в терапии опиоидной зависимости, а также опосредованно (за счет стабилизации ремиссии опиоидной наркомании) улучшают приверженность антиретровирусной терапии и её результаты у ВИЧ-инфицированных опиоид-зависимых больных.



Экспериментальное нейрофенотипирование поведения отчаяния в модели зебраданио

Лакстыгал А.М.¹, Демин К.А.^{1,2}, Кротова Н.А.^{1,2}, Ильин Н.П.¹, Таранов А.С.¹,
Калуев А.В.^{1,2,3}

1 – Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

2 – Институт Экспериментальной Медицины, Национальный Медицинский Исследовательский центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

3 – School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing, China

Животные модели и тесты широко используются для исследования патологий, связанных с стрессом. Один из стандартных методов оценки поведения, связанного с отчаянием, является помещение животного в ситуацию неизбежного стресса, как например, тест подвешивания за хвост Стеру у грызунов. Недавно нами был предложен аналогичный тест для оценки поведения отчаяния у *Danio rerio* (зебраданио) – Тест Иммобилизации Хвоста (ТИХ). В данной работе мы используем автоматические методы регистрации поведения для оценки влияния стресса на поведение зебраданио в ТИХ. В работе использовались взрослые короткохвостые *Danio rerio*, содержащиеся в стандартных лабораторных условиях. Перед тестированием рыбы были в незнакомом аквариуме подвергнуты различным стрессовым манипуляциям. В Эксперименте 1 (n=15) рыбы были подвергнуты действию низковольтного электрического тока (0.1 в/см воды) в течение 30 сек. В Эксперименте 2 (n=9-11) рыбы были подвергнуты действию 2 мл. свежееизготовленного феромона тревоги в течение 5 минут. В Эксперименте 3 рыба (n=11-13) была подвергнута действию яркого (60 Вт) света в течение 30 минут. В ТИХ каудальная часть рыбы была обездвижена в течение 6 минут с использованием губки, расположенной прямо над поверхностью воды таким образом, что краниальная часть рыбы оставалась в небольшом аквариуме, заполненном водой. Автоматическая оценка поведения производилась в программе Noldus EthoVision XT 11.5. Для статистического анализа использовался тест Манна-Уитни (U-test). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Оценивались такие параметры как дистанция (см) пройденная центральной точкой рыбы, время, проведенное центральной точкой в движении (сек), общая подвижность тела рыбы (%), время, проведенное всем телом подвижно и неподвижно (сек). В Эксперименте 1 электрический шок оказал выраженное воздействие на поведение рыб в ТИХ, приведя к статистически значимому снижению дистанции (193.45 ± 35.63 и 58.90 ± 19.36 (здесь и далее контрольная группа против экспериментальной) см.,



$p < 0.001$ U-test), времени движения центральной точки (39.95 ± 8.62 и 9.29 ± 4.30 сек., $p < 0.001$ U-test), общей подвижности (14.06 ± 2.51 и 4.46 ± 0.86 %, $p < 0.001$ U-test), времени проведенного подвижно (32.75 ± 6.91 и 5.42 ± 2.15 сек, $p < 0.005$ U-test) и неподвижно (290.77 ± 14.38 и 343.09 ± 5.74 сек, $p < 0.001$ U-test). В Эксперименте 2 наблюдалось значимое снижение времени движения центральной точки (12.92 ± 5.59 и 3.72 ± 1.08 сек., $p < 0.05$ U-test), общей подвижности (7.94 ± 1.79 и 4.43 ± 0.54 %, $p < 0.05$ U-test), времени проведенного всем телом неподвижно (320.68 ± 10.95 и 348.12 ± 3.98 сек, $p < 0.05$ U-test), но не времени проведенного подвижно ($p > 0.05$). В эксперименте 3 не наблюдалось статистически значимых отличий используя U-test. Данные, полученные в результате экспериментов, аналогичны ранее опубликованным данным ручной обработки (Lakstygala et al. 2019), что подтверждает возможность анализа теста автоматизированными методами и его большой потенциал для высокопроизводительного скрининга антидепрессантов.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда №19-15-00053. За счет средств гранта РФ были получены поведенческие данные о поведении отчаяния *Danio rerio*, а также обеспечено финансирование освещения результатов работы. Работа Демина КА поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований №18-34-00996, стипендией Президента РФ для студентов и аспирантов обучающихся по приоритетным направлениям и Специальной Ректорской стипендией для обучающихся в аспирантуре СПбГУ. За счет средств гранта РФФИ и стипендиальных средств была разработана модель отчаяния *Danio rerio*.*



Проекты по изучению геномики и генетики психических заболеваний в ИТБМ СПбГУ

Левченко А.

Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Коллективом применяются методы полногеномного генотипирования и таргетного секвенирования нового поколения с помощью оборудования компании Illumina (USA) для обнаружения генетических вариаций, ассоциированных с психическими заболеваниями. Проводятся функциональные исследования обнаруженных генетических вариаций. В перспективе, планируется определение информативных биомаркеров в контексте персонализированной психиатрии. Биоинформатический и биостатистический анализы проводятся в сотрудничестве с проф. А.А. Канапиным, проф. А.А. Самсоновой и магистрантом Т.И. Нургалиевым в ИТБМ СПбГУ. Организационные аспекты проектов обеспечиваются профессором Р.Р. Гайнетдиновым, директором ИТБМ СПбГУ.

В частности, коллективом изучается когорта, состоящая из 505 пациентов с диагнозом параноидная шизофрения и 503 здоровых лиц, созданная коллегами, под руководством проф. С.А. Ивановой, в Лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Образцы ДНК данной когорты были подготовлены на базе Ресурсного Центра «Центр Биобанк» Научного Парка СПбГУ. В данный момент, завершено полногеномное генотипирование (640 000 SNPs) с использованием биочипа Infinium Global Screening Array-24 и сканера биочипов iScan от Illumina, проведённое на базе ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства. Электронные файлы с результатами генотипирования переданы Консорциуму по психиатрической геномике (Psychiatric Genomic Consortium, PGC), членами которого являются, в том числе, А.Ю. Левченко, Р.Р. Гайнетдинов и С.А. Иванова. Данный Консорциум, который организывает совместный анализ сотен тысяч пациентов с психическими заболеваниями со всего мира, к данному моменту завершил совместный анализ когорты из 70 000 пациентов с шизофренией. Также в ИТБМ ведётся независимый анализ результатов при помощи биостатистических методов полногеномного поиска ассоциаций (genome-wide association study, GWAS), в том числе поиск ассоциации с отдельными субфенотипами и ответом на терапию (фармакогеномика). Коллектив также готов к таргетному секвенированию нового поколения избранных регуляторных последовательностей у данной когорты с



использованием системы высокопроизводительного секвенирования MiSeq от Illumina в контексте эволюционной геномики.

Одновременно изучается когорта, состоящей из 224 пациентов с алкогольной зависимостью и 1059 здоровых лиц, созданной коллегами из Национального научного центра наркологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П.Сербского» Минздрава России (А.О. Кибитов), и Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и неврологии им. В.М.Бехтерева (проф. Е.М. Крупицкий). Образцы ДНК данной когорты также были подготовлены на базе Ресурсного Центра «Центр Биобанк» Научного Парка СПбГУ. В данный момент, проводится анализ результатов полногеномного генотипирования согласно методам, применяемым для когорты с диагнозом параноидная шизофрения. В дальнейшем, планируется проведение аналогичного GWAS.

Коллектив также активно сотрудничает с коллегами из НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра РАН в рамках фармакогенетических проектов. Используются как методы исследования ассоциации генов-кандидатов с ответом на терапию, так и таргетного секвенирования нового поколения.

Коллектив также участвует в функциональные исследованиях, нацеленных на изучение молекулярных механизмов обнаруженных генетических вариаций с помощью моделей заболевания, индуцированных нейрональных стволовых клеток человека, в сотрудничестве с Лабораторией клеточной биологии, ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства. В частности, проходят первые этапы изучения обнаруженной ранее ультра-редкой кодирующей. Планируются аналогичные подходы в изучении некодирующих генетических вариаций, обнаруженных в ходе таргетного секвенирования когорты с параноидной шизофренией, а также в изучении кодирующих и некодирующих вариаций в рамках иных проектов.

В перспективе, коллектив планирует включение когорт с депрессивным расстройством, биполярным аффективным расстройством и расстройствами пищевого поведения, которые создаются на базе НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и неврологии им. В.М.Бехтерева, и Национального научного центра наркологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П.Сербского» Минздрава России.



Новые подходы к разработке препаратов для лечения патологий ЦНС.

Лопачев А.В.¹, Куликова О.И.¹, Куличенкова К.Н.¹, Бережной Д.С.^{1,2}, Девятков А.А.¹, Музычук О.А.¹, Тимошина Ю.А.^{1,2}, Абаимов Д.А.¹, Евдокименко А.Н.¹,
Стволинский С.Л.¹, Федорова Т.Н.¹

1 – Научный центр неврологии, Москва, Россия;

2 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Разработка эффективных препаратов нейропротекторного действия остается актуальной проблемой современной неврологии. В лаборатории клинической и экспериментальной нейрохимии ФГБНУ НЦН разработан комплексный подход к тестированию новых препаратов, который включает несколько основных этапов с учетом патогенетических особенностей и молекулярных механизмов развития заболеваний ЦНС. На первом этапе осуществляется компьютерное моделирование широкого спектра химических соединений и наноразмерных частиц-контейнеров, обладающих заданными химическими и биологическими свойствами (антиоксидант, антиагрегант и т.д.) и их взаимодействия с целевыми молекулами с последующим синтезом отобранных соединений и определением их физико-химических свойств. На втором этапе в экспериментах *in vitro* оценивается наличие заданных свойств у новых соединений, оценка их цитотоксичности на нейрональных культурах, эффективности и механизмов действия на различных клеточных моделях (общий окислительный стресс, эксайтотоксичность, паркинсонизм, ишемия и др.). В том случае, если механизм действия соединения подразумевает проникновение внутрь нейронов, то производится оценка эффективности его транспорта через плазматическую мембрану, а также стабильности внутри клеток. Те соединения, которые успешно проходят этап тестирования на нейрональных клеточных культурах, затем исследуются в моделях патологий ЦНС на лабораторных животных. В арсенале подразделения имеются модели экспериментального паркинсонизма, включая раннюю премоторную стадию заболевания, острой гипобарической гипоксии, а также модели фокальной ишемии/реперфузии головного мозга у грызунов. На данном этапе проводится оценка неврологической симптоматики, поведенческих характеристик и когнитивных функций мозга экспериментальных животных с последующим гистологическим анализом области поражения ткани мозга, нейрохимической характеристикой широкого спектра параметров, регистрируемых в плазме крови и ткани мозга животных. Проводимые исследования позволяют изучить механизмы действия новых препаратов, включая анализ маркеров



окислительного повреждения ткани мозга, нейротрансмиттеров, активности ферментов, связанных с защитой нейронов от стрессовых воздействий, стресс-активируемых сигнальных каскадов и соотношение белков-регуляторов апоптоза.

Новые соединения, показавшие свою эффективность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, патентуются, так лабораторией получены патенты на нанолипосомальный препарат с L-карнозином, комплекс липоевой кислоты с карнозином, соединение салициловой кислоты с L-карнозином и другие. Проводимые в лаборатории фундаментальные исследования направлены на разработку конечного продукта, который может быть использован в качестве лекарственного препарата в лечении заболеваний ЦНС. Лаборатория клинической и экспериментальной нейрхимии, как и другие подразделения ФГБНУ НЦН, открыта для новых направлений научного сотрудничества.



Accumulation of amyloid beta (A β) peptide after ischemic stroke

Antonio Henrique Martins¹, Astrid Zayas-Santiago², Yancy Ferrer-Acosta³,
Solianne Martinez³, Lidia Zueva², Amanda Diaz², and Mikhail Inyushin²

1-Pharmacology and Toxicology Department, University of Puerto Rico, Medical Sciences Campus, Guillermo Arbona, Área de Centro Médico Río Piedras, PR 00935 Tel.787-758-2525.

2-Department of Physiology, Universidad Central del Caribe Ave. Laurel #100, Santa Juanita, Bayamón, Puerto Rico, 00956. Tel: 798-7983001 ext. 2031.

3-Department of Neurosciences, Universidad Central del Caribe Ave. Laurel #U26, Santa Juanita, Bayamón, Puerto Rico, 00956. Tel: 798-7983001 ext. 2031.

Abstract: It is well known that amyloid beta (A β) peptides can be generated in blood vessels, released into the brain during thrombosis, and temporarily accumulate in this organ after injury. Here we demonstrate that 24 h after transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO), one of the standard models of focal ischemic stroke, A β peptide accumulates in the brain, concentrating on the blood vessel walls. Because A β oligomers are known to induce significant damage to brain cells, these peptides act as an additional damaging factor during ischemic stroke. Considering that these A β oligomers have been shown to form ion channels in cells, affecting osmotic balance, we used an A β peptide channel blocker, tromethamine (2-Amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol), to prevent this additional injury. Tromethamine injected 1 g/100 g body weight intraperitoneally at 5 minutes before tMCAO decreased blood-brain-barrier leakage and water content, as measured by Evans blue staining and dry brain weight, respectively. Congo red staining, which binds only to A β polymers (amyloid), showed that there was no significant presence of plaques. Therefore, we suggest that A β peptide oligomers are responsible for some of the brain damage during stroke and that blockage of the ion channels that they form could be beneficial in treating this complex neurological syndrome.



Передача катехоламинов в базолатеральной миндалине: влияние социального поражения и этанола

Михайлова М.А.¹, Онохин К.В.¹, Будыгин Е.А.², Гайнетдинов Р.Р.¹.

¹ - *Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

² - *Department of Neurobiology and Anatomy, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA*

Базолатеральная миндалина (BLA) является одной из критических областей мозга, участвующей в многочисленных процессах, таких как обучение и возникновение зависимости. Такие катехоламины (CA) как дофамин (DA) и норадреналин (NE) присутствуют в BLA, и было показано, что их аксонные терминалы идут из вентральной области покрышки (VTA) и голубого пятна (LC), соответственно. Однако изучение высвобождения DA и NE в реальном времени в BLA является сложной задачей из-за их электрохимического сходства и относительно низких концентраций в этой области. Кроме того, в нескольких исследованиях уже измерялось влияние социального поражения на норадренергическую передачу сигналов в BLA. Поэтому в текущем эксперименте была предпринята попытка использовать быструю сканирующую циклическую вольтаметрию (FSCV) в сочетании с фармакологическим подходом для анализа высвобождения DA и NE в BLA, вызванного электрической стимуляцией LC у крыс, подвергшихся воздействию социального поражения. Кроме того, измерялось влияние острого введения этанола на LC-индуцированное высвобождение CA в BLA. Самцы крыс линии Спрег-Дуоли в течение пяти последовательных дней были подвержены 45-минутным сеансами социального поражения, где физическое взаимодействие происходило в течение первых 15 минут с более крупным самцом Лонг-Эванс. Последние 30 минут сеанса социального поражения проводились в защитной сетке из проволоочной сетки, но обеспечивающей визуальное, слуховое и обонятельное взаимодействие. Через неделю после последнего сеанса социального поражения проводились FSCV-измерения высвобождения CA в BLA после электрической стимуляции LC. Для идентификации DA или NE, были введены инъекции селективного антагониста $\alpha 2$ -адренергического рецептора идазоксана (5 г/кг, i.p.) или селективного антагониста D2-дофаминового рецептора раклоприда (2 г/кг, i.p.). Полученные данные показывают, что стимуляция LC у субъектов, не подвергавшихся стрессу и алкогольному воздействию, вызывает преимущественно высвобождение норадреналина. В противоположность этому, было зафиксировано высвобождение как NE, так и DA в BLA после стимуляции LC у крыс, подвергшихся стрессу из-за социального поражения. Кроме того, острая инъекция этанола (2 г/кг, i.p.) снижала



сигнал СА у крыс, подвергшихся социальному поражению, и не влияла на крыс, не подвергавшихся стрессу, по сравнению с контролем с введением физиологического раствора. Эти результаты свидетельствуют о том, что стресс, вызванный социальным поражением, модулирует катехоламиновый сигнал в ВЛА, вызванный стимуляцией ЛС, что приводит к значительному увеличению вклада DA и ухудшению сигнала СА в присутствии этанола.

Грант: РФФИ 18-315-00273 мол_а



Изучение функциональной роли рецепторов следовых аминов TAAR9

Муртазина Р.З.¹, Куварзин С.Р.¹, Ефимова Е.В.¹, Коренькова О.М.¹, Аленина
Н.В.^{1,2}, Гайнетдинов Р.Р.¹

1. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ,

г. Санкт-Петербург, Россия

2. Molecular Biology of Peptide Hormones, The Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association (MDC)

Открытие в 2001 году нового класса рецепторов – рецепторов к следовым аминам (TAARs) дало возможность для понимания функциональной роли эндогенных следовых аминов в физиологии и патологии млекопитающих. Данное семейство относится к обширной группе рецепторов, связанных с G-белком (GPCR). Следовые амины (β -фенилэтиламин, тирамин, триптамин и октопамин) структурно близки к классическим моноаминам и играют важную роль в физиологии беспозвоночных, но их функции в организме млекопитающих остаются недостаточно изучены. У человека найдено 9 генов (TAAR1-TAAR9), два из которых являются псевдогенами. В настоящее время исследования TAAR сосредоточены в основном на TAAR1. На данный момент информация об экспрессии и функциональных свойствах рецептора TAAR9 в литературе практически отсутствует. Также нет данных об изменениях, которые может внести нокаут гена этого рецептора.

Ранее в нашей лаборатории при помощи метода CRISPR/Cas9 были созданы две линии крыс породы Sprague Dawley с мутациями, приводящими к нокауту гена TAAR9 (*insA* и *delC*). Поэтому целью данной работы стала оценка возможных различий в поведении нокаутных животных и животных дикого типа. Для этого были использованы три группы животных (самцы, возраст 3-4 месяца, масса тела ~150-200 г, n=10): нокаут *insA*, нокаут *delC*, дикий тип. Проводили тесты на тревожность («Крестообразный приподнятый лабиринт»), исследовательскую деятельность («Открытое поле»), память («Открытое поле с новым объектом» и «Т-тест»), а также термометрию.

В тесте «Открытое поле» показатели пройденной дистанции, число подъемов на задние лапы, время, проведенное в центральной зоне, у нокаутов достоверно не отличались от животных дикого типа. Однако, у нокаутов было повышено время груминга, что может указывать на снижение уровня тревожности. В тесте же «Крестообразный приподнятый лабиринт» отличий ни по одному из параметров не было. В тестах на память («Т-тест», «Открытое поле с новым объектом») значимых



отличий также выявлено не было. Интересной особенностью нокаутных животных обеих линий стала повышенная температура тела по сравнению с диким типом, что может свидетельствовать об изменениях в физиологии, которые необходимо исследовать. Стоит отметить, что повышенная температура наблюдалась и у линий с нокаутом гена TAAR6.

Данные предварительные результаты показывают, что нокаутные животные по гену TAAR9, возможно, менее тревожны, чем животные дикого типа и имеют изменения в температуре тела. В дальнейшем планируется оценить содержание моноаминов в клетках тканей мозга, а также уровень экспрессии различных нейрональных маркеров.



Амилоиды и прионы от патологии к биологии

Рубель А.А.¹, Зелинский А.А.¹, Маликова О.А.¹, Качкин Д.В.¹, Майтова А.В.¹,
Куличихин К.Ю.¹, Гризель А.В.¹, Аксёнова А.Ю.¹, Федотов С.А.¹, Чернов
Ю.О.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург 199034,

²Georgia Institute of Technology, USA, Atlanta, GA 30332-2000;

*arubel@mail.ru

Амилоиды – самособирающиеся белковые агрегаты фибриллярной природы, для которых характерно формирование межмолекулярных кросс-бета структур. Особый интерес к амилоидам связан с тем, что они ассоциированы более чем с 50-ю заболеваниями человека и животных (амилоидозов), включая такие социально значимые заболевания, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабет II типа и боковой амиотрофический склероз, а также инфекционные амилоиды – прионы, вызывающие такие болезни как коровье бешенство (передающееся человеку) и болезнь Кройцфельда-Якоба. По последним данным, амилоиды связаны с преэклампсией (гестозом), некоторыми формами рака, хотя пока неясно, являются ли они агентами, вызывающими эти заболевания, или только биомаркерами. Наряду с патологическими амилоидами появляется всё больше данных об амилоидах, выполняющих важные биологические функции, такие как регуляция долговременной памяти, участие в полимеризации меланина, хранение пептидных гормонов, формирование биоплёнок. У грибов, амилоиды (прионы грибов) являются менделевскими наследуемыми элементами. Понимание роли амилоидов в биологических и патологических процессах необходимо для разработки новых профилактических методов и терапевтических подходов.

Имеющиеся данные об амилоидах носят разрозненный характер и не позволяют в полной мере оценить распространённость и значимость амилоидов в живой природе, в том числе у человека. Как правило, новые функциональные и патологические амилоиды выявляют не вследствие системного анализа, а в результате изучения свойств отдельных белков или исследования конкретных патологий. Биоинформатические алгоритмы для предсказания амилоидогенного потенциала не точны и требуют проверки *in vivo*, которая до недавнего времени была затруднена, поскольку не существовало универсальных методов идентификации потенциально амилоидогенных белков и амилоидов. Нами разработаны подходы, которые позволяют выявлять амилоидогенный потенциал различных белков и проводить масштабные скрининги протеомов и библиотек. Эти экспериментальные



подходы использованы для проверки амилоидогенного потенциала белков человека, предсказанного *in silico*, а также для масштабного поиска амилоидогенных белков в протеоме человека. Полученные данные позволят выявить и охарактеризовать новые амилоидогенные белки, улучшить существующие алгоритмы предсказания амилоидогенного потенциала белков и определить фракцию человеческого протеома, способную к образованию амилоидов (амилоидом). Выявление роли амилоидов в нормальных процессах жизнедеятельности откроет новые пути к регуляции этих процессов с целью улучшения здоровья человека.

Данная работа была выполнена при поддержке грантов РФФ 18-74-00041 и РФФИ 18-04-00799. Для исследований использовали приборную базу ресурсных центров СПбГУ: «ЦКП ХРОМАС», «РМиКТ».



Актуальность методов физической локализации последовательностей на хромосомах в эру геномики.

Сайфитдинова А.Ф.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», кафедра анатомии и физиологии человека и животных факультета биологии;

²АО «Международный центр репродуктивной медицины», лаборатория вспомогательных репродуктивных технологий, Санкт-Петербург, Россия; saifitdinova@mail.ru

Физическая локализация последовательностей ДНК на хромосомах основана на использовании метода гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*. В основе метода гибридизации лежит матричный принцип копирования наследственной информации и принцип комплементарности азотистых оснований в цепи ДНК. Суть матричного копирования состоит в том, что наследственная информация передается от одного носителя к другому по принципу матрицы и слепка, т.е. если есть матрица, то всегда можно получить слепок, или, наоборот, обладая слепком, можно восстановить матрицу. Синтезируемая ферментом полимеразой новая нить ДНК получается комплементарной исходной матрице по составу входящих в нее оснований и идентична второй нити ДНК, которая в природе входит в состав двунитевой спирали ДНК (ДНК дуплекс). Оказалось, что способность нуклеиновых кислот находить комплементарную пару и связываться с ней за счет описанных Дж. Утсоном и Ф. Криком молекулярных взаимодействий, позволяет довольно точно определить локализацию практически любой последовательности ДНК на препарате. Впервые это свойство нуклеиновых кислот было использовано в 1969 году Дж. Голлом и М.-Л. Пардью для выявления на препарате рибосомных РНК, с этого времени и начинается отсчет развития методов гибридизации *in situ*. Впоследствии он нашел широкое применение в сравнительной цитогенетике, исследованиях пространственной организации ядра и исследованиях по эволюции кариотипов. Развитие методов секвенирования и сборки целых геномов вызвало необходимость применения физического картирования последовательностей на хромосомах и увеличило востребованность метода гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*. При необходимости, гибридизацию *in situ* можно сочетать с другими методами исследования, в том числе включением меченых предшественников биополимеров, иммуноцитохимическим окрашиванием. Помимо решения исследовательских задач, она является мощным диагностическим инструментом для медицинской цитогенетики, преимплантационной, пренатальной и постнатальной генетической диагностики, а также является важнейшим методом для диагностики природы



онкологических заболеваний, позволяющим осуществить направленный выбор таргетной терапии.

В докладе будет освещен собственный опыт автора в развитии и применении методов физической локализации последовательностей ДНК для решения фундаментальных и прикладных задач, а также сделан акцент на уникальных возможностях применения метода для выявления особенностей локализации в кариотипе сложных для анализа молекулярными методами районов, насыщенных повторяющимися элементами генома.



Исследование роли митофюзина 2 в развитии ранней патологии в дофаминергических нейронах

Сопова Е.С.^{1,2}, Онохин К.В.¹, Li S.², Сопов А.А.¹, Floridana R.², Коренькова О.В.¹, Larsson N.G.² и Шупляков О.В.^{1,2}

1 - Институт трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;

2 - Каролинский институт, Стокгольм, Швеция.

e-mail: oshupliakov@yandex.ru

Нарушения функций митохондрий в нейронах связывают с развитием ранней патологии целого ряда нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона. Это заболевание сопровождается селективной гибелью дофаминергических нейронов у человека, как правило в зрелом возрасте. В целях выяснения роли белков, участвующих в динамике митохондриальной мембраны, в развитии ранней патологии БП мы исследовали эффекты селективного выключения гена митофюзина 2 (MFN2) у взрослых животных с сформированными дофаминергическими нейронами. Считается, что белок MFN2 вместе с MFN1 контролируют слияние наружной мембраны при слиянии митохондрий. Запуск экспрессии Cre с последующей рекомбинацией фланкированного гена осуществлялся с помощью тамоксифена. Идентификация дофаминергических нейронов производилась в результате селективной экспрессии флюоресцентного маркера (GFP) в нейронах, а также с помощью иммуногистохимии. Выключение гена приводило к ранней гибели животных через 10-12 недель. Чтобы проследить динамику структурных изменений в митохондриях нейронов мы проводили анализ трехмерной ультраструктуры органелл через 3, 6 и 9 недель после введения тамоксифена. Наши исследования показали, что митохондрии в теле клеток в первую очередь претерпевают структурные изменения. Они изменяют форму, становятся сферическими. При этом происходит н аномальное набухание крист и накопление внутренней мембраны митохондрии внутри органелл. В теле клетки эти процесс наблюдаются уже через 3 недели, а в синапсах клетки только через 9 недель. Через 9 недель после введения тамоксифена происходит нарушение целостности мембран у большого количества митохондрий, при этом наблюдается гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции и уменьшение числа синаптических проекций в стриатум. Наши исследования подтверждают важную роль гена MFN2 в выживании дофаминергических нейронов. Ранее нарушение функций митофюзина 2 связывали с фрагментацией органелл. Наши исследования позволяют



Санкт-Петербургский
государственный
университет



полагать, что белок играет важную роль в координации процессов, контролирующих
синхронное слияние и деление наружной и внутренней мембраны митохондрий.

Работа поддержана грантами РФФ № 16-15-10273, СПбГУ и Parkinsonfonden.



Убаин вызывает мание-подобное поведение у мышей через активацию D2 дофаминовых рецепторов

Тимошина Ю.А.^{1,2}, Лопачев А.В.^{1,4}, Вольнова А.Б.^{3,4}, Казанская Р.Б.³,
Завьялов В.А.³, Абаимов Д.А.¹, Лопачева О.М.^{1,2}, Федорова Т.Н.¹,
Гайнетдинов Р.Р.⁴

1 – Научный центр неврологии, Москва, Россия; 2 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; 3 – Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; 4 – Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Убаин относится к группе кардиотонических стероидов (КТС) – специфических ингибиторов Na,K-АТФазы. На данный момент существует множество предпосылок того, что КТС могут синтезироваться в организме млекопитающих и являются регуляторными гормоноподобными соединениями. В свою очередь, в мозге наблюдается наибольшее разнообразие изоформ Na,K-АТФазы, отличающихся по сродству к соединениям данного класса. На данный момент нет полного понимания физиологических функций КТС и Na,K-АТФазы в мозге. Целью данной работы была оценка вклада дофаминергической системы в развитие мание-подобного поведения у мышей, вызванного убаином. Мышам линии C57Black вводили интрацеребровентрикулярно по 0,5 мкл 50 мкМ убаина билатерально. Введение убаина привело к 1,5-кратному увеличению общего расстояния, пройденного мышью в тесте «Открытое поле» в течение 20 мин. Также такие животные демонстрировали выраженное исследовательское и стереотипическое поведение. При использовании за 30 мин до введения убаина ингибитора D2 дофаминовых рецепторов, галоперидола (70 мкг/кг внутривентрикулярно), не происходило повышения двигательной активности, а также проявления стереотипического поведения по сравнению с контрольной группой. Кроме того, через час после введения убаина увеличивалось содержание в стриатуме метаболитов дофамина: 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC) в 1,32 раза и гомованилиновой кислоты (HVA) в 1,42 раза по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об увеличении внеклеточной концентрации дофамина. Введение убаина также приводило к активации киназ Akt и ERK1/2 и деактивации GSK3 β в стриатуме мышей через 30 минут после инъекции. Эффект не проявлялся при совместном введении галоперидола и убаина. Следовательно, можно заключить, что введение убаина вызывает изменение активации данных сигнальных каскадов через D2 рецепторы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие КТС с Na,K-



Санкт-Петербургский
государственный
университет



АТФазой функционально влияет на дофаминергическую систему и может быть вовлечено в развитие нейропсихиатрических и неврологических заболеваний, связанных с нарушением работы дофаминергической системы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-01002.



Лимбальные стволовые клетки в условиях *in vitro*

Хорольская Ю.И.¹, Александрова О.И.¹, Писугина Г.А.¹, Качкин Д.В.²,
Михайлова Н.А.¹, Блинова М.И.¹

¹ Федеральное государственное учреждение науки Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб.
7/9

Достаточно часто при различной патологии переднего отрезка глазного яблока развивается синдром лимбальной недостаточности, возникающий в результате дисфункции, повреждения или гибели лимбальных стволовых клеток (ЛСК), которые обеспечивают обновление эпителия роговицы. Далеко не всегда удается добиться восстановления поврежденных тканей при помощи традиционных методов, поэтому встает вопрос о разработке биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), способных компенсировать потерю функциональности ЛСК. В последние годы все большее число научных исследований сосредоточено на поиске оптимального источника клеток, необходимых для создания клеточных продуктов, направленных на восстановление роговицы глаза. Клетки лимба являются стволовыми для эпителия роговицы и необходимы для обеспечения ее целостности и прозрачности, однако, в связи с острой нехваткой донорского материала необходимо создание условий для поддержания культуры ЛСК в условиях *in vitro*, а также создание биобанка ЛСК.

В ходе работы с помощью ферментативного и миграционного методов из склерально-лимбально-роговичных (СЛР) биоптатов были выделены гетерогенные популяции стволовых клеток лимба человека и кролика. ЛСК человека были получены из СЛР биоптатов кадаверных глаз человека, ЛСК кролика — из СЛР биоптатов кролика, полученных при формировании модели тотальной лимбальной недостаточности у кроликов породы Шиншилла. В культуре до первого пассажа наблюдали в основном эпителио-подобные колонии. После нескольких пассажей в популяции наблюдали в основном клетки МСК-подобной морфологии, было показано, что в таком состоянии культура способна к криоконсервации. В ходе анализа структуры актинового цитоскелета было выявлено, что клетки имеют четко организованный актиновый скелет, равномерно распределенный по объему клетки. Актин в основном сосредоточен в пучках филаментов.

Выделенные из ткани лимба ЛСК кролика были охарактеризованы по основным стволовым маркерам (p63a, ALDH3A1, ABCB5, ABCG2, Integrin β 1) и маркерам дифференцировки (цитокератины 3/12, 14, 15, 19, коннексин 43, PAX6). Несмотря на



то, что популяция частично приобретала статус МСК, в клетках наблюдали присутствие различных цитокератинов. Кроме того, было показано, что при культивировании ЛСК в эпителиальной ростовой питательной среде на границе «среда — воздух» в клетках увеличивается содержание цитокератина 14, что может говорить о способности данных клеток возвращаться к эпителиальному фенотипу.

Как ферментативный, так и миграционный метод выделения позволили получить достаточное для характеристики и банкирования количество ЛСК кролика. Первоначально гетерогенная - эпителиально-мезенхимная - культура в процессе культивирования приобрела гомогенный мезенхимный фенотип, однако было показано, что данная популяция способна к эпителиальной дифференцировке в условиях *in vitro*. Основываясь на полученных данных мы делаем предположение, что выделенная нами культура претерпевает частичный эпителиально-мезенхимальный переход.



Особенность распространения моногенных заболеваний в Северо-Западном регионе России

Шиков А.Е.^{1,2,3}, Барбитов Ю.А.^{1,2}, Скитченко Р.К.^{1,4}, Полещук О.И.²,
Серебрякова Е.А.^{3,5}, Насыхова Ю.А.^{1,5}, Полев Д.Е.⁶, Шувалова А.Р.⁶, Федяков
М.А.³, Глотов А.С.^{1,3,5}, Цай В.В.³, С.В. Макаренко^{1,3}, С.П. Уразов³, А.Ю.
Рудник³, А.М. Сарана¹, С.Г. Щербак^{1,3}, В.С. Баранов^{1,5}, Предеус А.В.², Глотов
О.С.^{3,5}

1 – Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

3 – Городская больница №40, Санкт-Петербург, Россия

4 – Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

5 – ФГБНУ НИИ им. Д.О. ОТТА, Санкт-Петербург, Россия

6 – ООО «Сербалаб», Санкт-Петербург, Россия

antonshikov96@gmail.com

Существенный прогресс в области технологий NGS (next-generation sequencing) обеспечил условия для применения методов экзомного секвенирования в рутинной клинической практике. Это позволяет придерживаться персонализированного подхода в медицине, что даёт возможность для более точного диагностирования заболеваний и назначения терапии. Для адекватной клинической интерпретации данных NGS необходимо аккуратное выявление частот нереперенсных аллелей в популяции, что служит основным критерием определения патогенности вариантов.

К сожалению, Россия в отношении генетических данных до сих пор остаётся белым пятном. Даже крупнейший проект gnomAD практически не включает Российскую популяцию. Для восполнения этого пробела мы проанализировали около 700 экзотов пациентов в Северо-Западном регионе России. 80% исследуемых пациентов были этнически русскими.

В ходе проведенного исследования нами было обнаружено более 54000 вариантов, данных о которых отсутствуют в современных базах, таких как dbSNP 151 и gnomAD 2.1. Для расчёта представленности моногенных заболеваний мы просуммировали все обнаруженные патогенные варианты для определённых генов. Мы выявили большую представленность для таких заболеваний, как фенилкетонурия, болезнь Штаргардта, муковисцидоз и недостаточность VII фактора свёртываемости крови по сравнению с мировой популяцией.

Таким образом, наше исследование позволило охарактеризовать преобладающие патогенные аллели для Северо-Западного региона России. Эти данные



Санкт-Петербургский
государственный
университет



могут быть полезны как исследователям-генетикам, так и клиницистам, поскольку позволяют более точно оценить риски развития патогенных состояний, специфичных для Российской популяции.