

# КРАТКИЙ АННОТАЦИОННЫЙ ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ ФАКУЛЬТЕТА ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ ЗА 2013 ГОД

## Тема 1. Перинатальная охрана здоровья плода (руководители – академик РАМН Савельева Г.М. и проф. Панина О.Б., кафедра акушерства и гинекологии)

В настоящее время преждевременные роды принято рассматривать как мультифакториальный синдром. Точные причины, приводящие к преждевременным родам, остаются до конца не изученными, однако, выделяют четыре основных патогенетических пути реализации данного синдрома: стресс матери и/или плода, воспаление в децидуальной ткани, амнионе или хорионе, плацентарное или децидуальное кровотечение и механическое перерастяжение матки. Учитывая полиэтиологичность преждевременных родов, маловероятно, что единственный тест сможет идентифицировать пациенток группы риска. Соответственно, должен быть выработан алгоритм, который будет сочетать клинические факторы риска и биомаркеры.

В проспективное исследование было включено 189 пациенток, поступивших в стационар с клиническими симптомами угрожающих преждевременных родов. У всех пациенток были изучены прогностическая значимость состояния шейки матки по данным мануального исследования и трансвагинальной эхографии в отношении преждевременных родов. У 52 пациенток проведен анализ диагностической значимости биохимических показателей: ИФРСБ-1, ИЛ-6 в цервикальном секрете, прогестерона и эстриола в слюне методом иммуноферментного анализа.

Впервые предложена гипотеза последовательных стадий изменения шейки матки при угрожающих преждевременных родах. Установлено, что измерение длины шейки матки УЗ методом обладает большей прогностической значимостью по сравнению с методом мануальной оценки длины шейки матки и оценки «зрелости» шейки матки по шкале M.S.Burnhill в модификации Е.А.Чернухи. Показано, что из исследованных биохимических маркеров (ИЛ-6, ИФРСБ-1, эстриол, прогестерон) наибольшей прогностической значимостью при угрожающих преждевременных родах обладает концентрация ИЛ-6 в цервикальном секрете. Создана математическая модель, позволяющая точно рассчитать вероятность преждевременных родов на основании длины шейки матки по данным УЗИ и концентрации ИЛ-6 в цервикальном секрете.

Разработана тактика ведения угрожающих преждевременных родов на основании симптомов при поступлении, длины шейки матки по данным УЗИ, концентрации ИЛ-6 в цервикальном секрете, что позволяет избежать длительной необоснованной госпитализации, токолитической терапии и введения глюкокортикоидов.

## Тема 2. Прогностическое значение этиологических, генетических, клеточно-молекулярных и клинических особенностей заболеваний иммуновоспалительной и обменной природы для прогрессирования органной недостаточности (руководитель – академик РАН и РАМН Мухин Н.А., кафедра внутренних болезней)

Показано, что среди группы генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции функции эндотелия (метилентетрагидрофолатредуктазу, субъединицу p22phox NADPH-оксидазы, эндотелиальную NO-синтазу), и генов ренин-ангиотензиновой системы (ангиотензиногена и рецептора 1 типа к ангиотензину 2), носительство Т-аллели и ТТ-генотипа полиморфизма С242Т гена СУВА снижает риск развития хронического гепатита С, а GG-генотип полиморфизма G-6A гена AGT – повышает. У больных хроническим гепатитом С медленный темп прогрессирования фиброза ассоциируется с носительством С-аллель-содержащими генотипами полиморфизма С242Т гена СУВА, а также G-аллелью и G-аллель-содержащими генотипами гена AGT по локусу G-6A и М-аллелью и ММ-генотипом гена AGT по локусу M235T. Риск развития цирроза печени у больных хроническим гепатитом С ассоциирован с ТТ-генотипом полиморфизма С242Т гена СУВА и АА-генотипом полиморфизма G-6A гена AGT. Развитие и декомпенсация портальной гипертензии также ассоциируется с генотипом ТТ полиморфизма С242Т гена СУВА, кодирующего p22phox-субъединицу NADPH-оксидазы.

С наличием мутаций генов белков p22 и eNOS ассоциируется «омоложение» клинических маркеров поражения органов мишеней (почек, сердца) и развитие таких компонентов метаболического синдрома как гиперинсулинемия и инсулинорезистентность. Обращает на себя внимание, что с мутациями в этом гене в

нашем исследовании были сопряжены и ранние признаки поражения почек. У больных ожирением гомозиготное носительство патологического аллеля 667Т гена МТГФР ассоциируется с повышенной концентрацией АДМА, повышает риск гипертрофии интимы–медии в 3,33 раза и риск формирования поражения почек.

### Тема 3. Предупреждение слепоты при важнейших заболеваниях органа зрения (руководитель – проф. Акопян В.С., кафедра офтальмологии)

Учитывая наметившиеся тенденции к использованию комплексных лечебных технологий с применением высоко эффективных препаратов целевого молекулярного назначения при заболеваниях, сопровождающихся неоваскуляризацией, в рамках Контракта №23-405/13 от 21 июня 2013 г. по теме: «Доклинические исследования лекарственного средства на основе рекомбинантных эндогенных антиангиогенных пептидов на экспериментальных моделях ангиогенеза *in vivo*» (шифр заявки «2.1 Ангиостатик 2013-ФФМ») проводятся комплексные исследования по разработке и созданию отечественных генно-инженерных биотехнологий получения современных активных фармакологических субстанций с заданными антиангиогенными свойствами, разработанных с учетом литературных и собственных экспериментальных данных по изучению особенностей неоваскуляризации глаза и проведению доклинической оценки фармакологической активности рекомбинантных пептидов на моделях офтальмоангиопатий на глазном дне лабораторных животных.

Цель первого этапа НИОКР: разработать и сформировать модели офтальмоангиопатий на глазном дне двух видов лабораторных животных.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Произвести оценку временных сроков и этапов развития офтальмоангиопатий в зависимости от используемой модели;
- Установить продолжительность активной фазы офтальмоангиопатии в зависимости от выбранной модели (ретиальной и/или хориоидальной неоваскуляризации),
- Дать оценку воспроизводимости модели в зависимости от способа индукции и вида лабораторного животного.

По итогам 1 этапа исследований получены следующие основные результаты:

- Представлен краткий литературный обзор лабораторных исследований, которые проводились для формирования моделей офтальмоангиопатий с указанием достоинств и недостатков этих моделей, а также анатомических различий глаз использованных лабораторных животных с глазами человека. Проанализированы преимущества и недостатки широкого спектра моделей. Обоснован выбор моделей, разрабатываемых в настоящем проекте.

▪ Представлены результаты экспериментальных исследований по формированию 4-х моделей офтальмоангиопатий на глазном дне двух видов лабораторных животных.

- Установлено, что активное формирование сосудистых изменений и образований на всех выбранных и сформированных моделях офтальмоангиопатий идет в сроки от 7 до 28 дней. В перспективе эти сроки могут быть учтены при дальнейшей оценке фармакологической активности тестируемых пептидов антиангиогенного назначения.

▪ Показано, что процент успешного формирования изучаемых моделей на глазах экспериментальных животных достигает 66 % (кролики) и 75% (крысы).

После анализа полученных результатов были сделаны следующие выводы:

- По результатам анализа литературы обоснована целесообразность выбора моделей индуцированного ангиогенеза и вида экспериментальных животных.

• Разработаны 4 модели офтальмоангиопатии с внутриглазной неоваскуляризацией на глазном дне кроликов и 1 модель ангиогенеза на крысах.

• Сформированные модели охарактеризованы по временным срокам эволюции их развития и в зависимости от способа индукции ангиогенеза и вида лабораторного животного.

• Экспериментальные модели офтальмоангиопатий верифицированы достоверными методами: томографически, ангиографически и/или морфологически.

• Установлена воспроизводимость моделей неоваскуляризации в зависимости от вида лабораторного животного и модели.

• Наиболее перспективной и близкой по патофизиологическому механизму возрастной макулярной дегенерации человека признана комбинированная модель, заключающаяся в сочетании лазерной деструкции мембраны Бруха с последующим введением в супрахориоидальное пространство VEGF на носителе (матригель).

Принципиальная новизна работы заключается в том, что модели офтальмоангиопатий органично формируют многоуровневую систему доклинической оценки фармакологической активности тестируемых рекомбинантных пептидов. Каждый уровень этой системы может быть рассмотрен как этап эволюции

заболевания, протекающего с развитием офтальмоангиопатий. Одна модель (а) представлена ранними этапами патологического неоваскулярогенеза, который индуцирован нарушением анатомической целостности мембраны Бруха (путем нанесения «острой» лазерной травмы); она позволяет оценить фармакологическую активность рекомбинантных пептидов на этапе ранней пролиферации. Средние и завершающие этапы – модели офтальмоангиопатий, формируемые (б) под действием искусственно вводимого в зону нормального сосудистого ложа стимулятора пролиферации клеток сосудистого эндотелия (VEGF165) и (в) сочетания и взаимодействия факторов деструкции мембраны Бруха и локального размещения VEGF165.

В целом представленные результаты экспериментальных исследований проведены согласно программе работ, календарному плану на 2013 г и техническому заданию на 1 этап 2013 г.

Экспериментальные исследования проведены по стандартам GLP в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН силами трудового коллектива кафедры офтальмологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова.

Исследования выполнены в соответствии с Приказом МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Правила лабораторной практики в РФ» (Good Laboratory Practice, GLP) на лабораторных животных категории SPF (specific pathogen free).

Модели офтальмоангиопатий выполнены на двух видах лабораторных животных (кроликах и крысах) и верифицированы доступными методами (ангиографически и морфологически).

#### Тема 4. Развитие стратегий, направленных на повышение чувствительности опухолей, резистентных к химиотерапии, путём воздействия на энергетические системы клетки (руководитель – проф. Животовский Б.Д., лаборатория исследования механизмов апоптоза)

Одно из исследований лаборатории выполнено на мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани человека (ММСК), являющихся минимально-дифференцированными клетками-предшественниками с большим потенциалом к трансформации. ММСК обладают устойчивостью к пониженному содержанию кислорода, что свидетельствует о физиологических условиях гипоксии для этих клеток. Обнаружено, что культивация ММСК в условиях низкого содержания кислорода приводит к снижению продукции АТФ митохондриями, но стимулирует синтез АТФ в процессе гликолиза. В то же время, культивация при постоянной гипоксии не влияла на жизнеспособность ММСК, стимулировала их пролиферацию и снижала способность к дифференцировке. Выводы: при гипоксических условиях гликолиз обеспечивает клетки достаточной энергией, чтобы поддерживать некоммутированное, стволовое состояние ММСК. Концентрация кислорода в среде должна учитываться при разработке протоколов клеточной терапии.

Быстро пролиферирующие опухолевые клетки в условиях гипоксии зачастую приобретают устойчивость к гибели от противоопухолевых препаратов. Мы показали, что опухолевые клетки, выращенные в условиях 0,1% кислорода, более устойчивы к действию доксорубина и цисплатина. Оценка клеточной гибели по таким параметрам как высвобождение цитохрома *c* в цитозоль, активация каспазы-3 и расщепление PARP, показала снижение гибели клеток при гипоксии или ее химической стимуляции с помощью DFX. Гипоксия и DFX вызвали активацию транскрипционного фактора HIF1 $\alpha$ , а его ингибирование с помощью специфичных siRNA восстанавливало соответствующий нормоксии уровень клеточной гибели. В отличие от доксорубина и цисплатина, альфа-токоферилсукцинат – агент, воздействующий на митохондрии, индуцировал клеточную гибель вне зависимости от уровня содержания кислорода. При этом в условиях гипоксии клеточная гибель была выше по сравнению с нормоксией. Альфа-токоферилсукцинат может быть перспективным кандидатом для противоопухолевой терапии, стимулирующим гибель опухолевых клеток за счет воздействия на митохондрии.

Для изучения механизма активации каспазы-2 был произведен анализ развития событий в клетках карциномы яичника человека в ответ на обработку ДНК-повреждающим химиотерапевтическим агентом цисплатином. Для получения комплекса активации каспазы-2 были использованы гель-фильтрация в сочетании с последующей иммунопреципитацией (ИП) каспазы-2 из фракции. Анализ фракций после гель-фильтрации показал наличие каспазы-2 в высокомолекулярных фракциях только в обработанных цисплатином клетках, но не в контрольных клетках (Рис.1). Вестерн-блот образцов ИП продемонстрировал, что белок RAIDD, входящий в состав описанного в литературе комплекса PIDDosome, не взаимодействует с высокомолекулярной каспазой-2, и, следовательно, не входит в состав идентифицированного комплекса (Рис.2). Анализ ферментативной активности образцов ИП подтвердил наличие активированной формы каспазы-2 в составе выделенного комплекса. Таким образом, проведенное исследование впервые напрямую продемонстрировало существование в клетках карциномы яичника альтернативной платформы активации каспазы-2, не описанной в литературе. Анализ с помощью конфокального микроскопа локализации каспазы-2 в клетках карциномы яичника показал, что в этих клетках белок каспазы-2-EGFP локализуется преимущественно в ядре. На основании этих наблюдений был сделан вывод о наличии ядерной фракции

каспазы-2 в клетках Caov-4, что подтверждает гипотезу о существовании неизвестной в настоящее время ядерной функции каспазы-2.

## Тема 5. Рецепция и внутриклеточная сигнализация в прогениторных и мезенхимных клетках (руководитель – академик РАН и РАМН Ткачук В.А., кафедра биохимии и молекулярной медицины, лаборатория генных и клеточных технологий)

С помощью флуоресцентной микроскопии и  $\text{Ca}^{2+}$ -индикатора Fluo-4 анализировали способность различных агонистов гептаспиральных рецепторов (G-protein-coupled) стимулировать  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию в мезенхимальных стромальных клетках (МСК) жировой ткани человека в культуре. В частности, была идентифицирована ~5% субпопуляция клеток, специфически отвечающих на норадреналин мобилизацией внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Характерной особенностью этих клеток оказалось то, что ответы на норадреналин генерировались по принципу “все или ничего”: агонист либо не стимулировал детектируемую мобилизацию цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  при концентрации меньше пороговой (100–200 нМ), либо вызывал  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы практически максимальной амплитуды. Используя фотолиз фоточувствительного  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатора NP-EGTA, создавались локальные и глобальные изменения свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме МСК. Тотальное скачкообразное повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  выше порогового вызывало норадреналин-подобные ответы клеток. При локальном высвобождении  $\text{Ca}^{2+}$  скорость распространения  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в цитоплазме МСК на два порядка превышала скорость пассивного распространения за счет диффузии в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера. Эти факты свидетельствовали о том, что в МСК функционирует механизм, обеспечивающий  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное высвобождение депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ . Ингибиторный анализ показал, что из двух возможных мишеней внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , обеспечивающих запуск регенеративного процесса, – рианодинового рецептора и  $\text{IP}_3$ -рецептора – именно последний выполняет роль триггера. Полученные данные позволяют предположить, что триггерный характер ответов МСК на норадреналин определяется тем, что по достижении порогового уровня первоначальный агонист-зависимый подъем внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  стимулирует  $\text{IP}_3$ -рецепторы и запускает лавинообразный выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из депо.

В результате нашего исследования был обнаружен новый сигнальный механизм Т-кадгерин-зависимой регуляции проницаемости эндотелия. Гиперэкспрессия Т-кадгерина в эндотелиальных клетках вызывает фосфорилирование VE-кадгерина по тирозину в 731 положении (участок связывания с бета-катенином), клатрин-зависимый эндоцитоз VE-кадгерина и его последующую деградацию в лизосомах. Более того, гиперэкспрессия Т-кадгерина в эндотелии активирует малые G белки семейства Rho ГТФаз и полимеризацию актиновых стресс фибрилл. Таким образом, увеличение экспрессии Т-кадгерина вызывает разрушение ключевой молекулы регуляции межклеточной адгезии в эндотелиальных клетках VE-кадгерина, что, в свою очередь, снижает эндотелиальный барьер. Наши результаты указывают на значимую роль Т-кадгерина в регуляции барьерной функции эндотелия.

Определена роль полиморфизмов С1019Т гена коннексина-37 (Cx37) и G894Т гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в развитии инфаркта миокарда (ИМ) у лиц без коронарного анамнеза. Распространенность аллели G гена eNOS в группе больных ИМ на фоне ИБС составила 59,8%, а у пациентов с ИМ без предшествующего коронарного анамнеза - 75,6% ( $p < 0,01$ ). Генотип GG встречался в 32,1 и 54,3% случаев соответственно ( $p = 0,01$ ; отношение шансов - ОШ 2,5 при 95% доверительном интервале - ДИ от 1,3 до 4,9). Для гена Cx37 распространенность мутантного аллеля Т в группе больных ИМ на фоне ИБС составила 29,5%, а у пациентов с ИМ без предшествующего коронарного анамнеза - 59,8% ( $p < 0,01$ ). Генотип ТТ встречался в 7,1 и 42,5% случаев соответственно ( $p < 0,01$ ; ОШ 9,6 при 95% ДИ от 3,3 до 28,4). Среди пациентов с ИМ на фоне предшествующей ИБС не выявлено ни одного с сочетанием генотипов GG и ТТ, тогда как у пациентов с ИМ без предшествующего коронарного анамнеза такое сочетание обнаружено в 23,6% случаев ( $p < 0,01$ ). Определение полиморфизмов С1019Т гена Cx37 и G894Т гена eNOS может быть использовано для выявления генетической предрасположенности к развитию ИМ у пациентов с гемодинамически незначимым атеросклерозом и у практически здоровых лиц.

Ангиогенная терапия с помощью модифицированных клеток представляет собой перспективную методику лечения ишемических заболеваний сердца и конечностей. Стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) характеризуются доступностью в препаративных количествах (например, при проведении оперативных вмешательств в клинике или липосакции). Обладая достаточно высокой паракриной активностью, СКЖТ сами по себе могут использоваться для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Нами была проведена работа посвященная исследованию эффективности трансплантации в ишемизированную ткань СКЖТ, генетически модифицированных с помощью адено-ассоциированного вируса. По нашим данным в модифицированных клетках значительно повышалось содержание мРНК ангиопоэтина-1, однако количество мРНК FGF-2, HGF и урокиназного активатора плазминогена оставалось неизменным. На модели с имплантацией матригеля мышам нами было показано, что модифицированные СКЖТ обладают высоким ангиогенным потенциалом и вызывали формирование в матригеле капилляров и артериол. С использованием мышинной модели ишемии задней конечности нами было показано

восстановление кровотока в ишемизированной скелетной мышце, а также повышение плотности артериол и капилляров, не сопровождавшееся формированием ангиом. Трансплантация СКЖТ, модифицированных с помощью ААВ, характеризуется более выраженным терапевтическим эффектом по сравнению с немодифицированными СКЖТ и обладает высоким терапевтическим потенциалом для использования в клинике.

Работа выполнена на научном оборудовании, закупленном по Программе развития МГУ.

## Тема 6. Разработка автоматизированных систем хемилюминесцентного анализа свободнорадикальных процессов в клетках, тканях и биологических жидкостях человека и животных (руководитель – академик РАН Владимир Ю.А., кафедра медицинской биофизики)

На базе автоматических хемилюминометров, созданных при участии кафедры, (одноцветный и 12-цветный приборы) разработаны автоматизированные системы хемилюминесцентного анализа свободнорадикальных процессов в клетках, тканях и биологических жидкостях человека и животных, а также созданы следующие методы на их основе:

1. Определение образования супероксидных радикалов в изолированных митохондриях и в срезах тканей человека и животных, таких как ткани мозга, печени, сердца и других. Метод был использован для изучения механизма развития ранних форм паркинсонизма на моделях у лабораторных животных с целью разработки способов диагностики болезни Паркинсона на ранней (доклинической) ее стадии.
2. Определение продукции активных форм кислорода клетками крови человека и животных в норме и при различных заболеваниях (острые ожоги, диабет, сердечно-сосудистые болезни). Был разработан протокол анализа и показана эффективность метода для прогноза течения острой ожоговой болезни.
3. Определение антиоксидантной активности плазмы крови, в том числе антиоксидантных свойств сывороточного альбумина. Этим методом было показано, что под действием свободных радикалов при оксидативном стрессе происходит окисление тирозиновых и триптофановых остатков в альбумине, что приводит к появлению у него дополнительной антиоксидантной активности. Метод регистрации антиоксидантных свойств окисленного альбумина предложено использовать как тест на оксидативный стресс в организме человека и животных.

Разработанные автоматизированные системы хемилюминесцентного анализа свободнорадикальных процессов и созданные на их основе методы планируется внедрить в практику клинической лабораторной диагностики на следующем этапе исследований (2014-2018 гг).

Работа выполнена на научном оборудовании, закупленном по Программе развития МГУ.

## Тема 7. Оценить роль редокс-сигнальной системы в защитных эффектах адаптации к изменению уровня кислорода (руководитель – проф. Архипенко Ю.В., лаборатория адаптационной медицины)

Предварительная адаптация крыс к гипоксии-гипероксии, но не гипоксии-нормоксии предупреждает изменения, вызванные приемом токсикантов - бензола и  $K_2Cr_2O_7$ : отсутствует задержка роста животных, повышается физическая выносливость, восстанавливается уровень фактора транскрипции HIF-1 и иницируемых им белков семейства HSP. Применение кратковременной (8 дней) адаптации к периодической гипоксии-гипероксии в условиях интоксикации позволило нормализовать повышенную относительно контроля интенсивность окислительных процессов, что сопровождалось возвращением активности антиоксидантных ферментов к контрольному уровню. Происходило достоверное повышение длительности тестирующего плавания.

Альтернативный сплайсинг гена IGF-I приводит к сдвигу рамки считывания и появлению С-концевой последовательности (Е-домен), которая кодируется 5 и 6 экзонами гена IGF-I. С-терминальный пептид (Е-пептид) может влиять на метаболизм мышечного волокна независимо от остальной молекулы MGF. Е-пептид, активируя сателлитные клетки, индуцирует деление одноядерных миобластов, что приводит к развитию гипертрофии мышц и их репарации. Снижение синтеза MGF основная причина, из-за которой происходит уменьшение объема мышечной массы у больных дистрофией и пожилых людей. Эффекты Е-пептида MGF при его введении в мышечную ткань не исследованы. Задача работы состояла в анализе эффектов Е-пептида MGF при внутримышечном введении на анаболические и протеолитические сигнальные пути в *m. gastrocnemius medialis* крысы на фоне факторов, активирующих процессы катаболизма в скелетной мышце. Показано, что: 1. в ответ на механическое повреждение в мышце активируется синтез MGF; 2. введение Е-пептида может приводить к подавлению распада регуляторных и стимулированию протеолиза

структурных белков только на фоне регулярных физических нагрузок; 3. сигнальные эффекты хронического введения E-пептида зависят от уровня сократительной активности исследуемых мышц.

При космическом полёте у мышей отсутствует стресс, происходит атрофия постуральных (*m. soleus* и *m. longissimus dorsi*) и локомоторных (*m. tibialis anterior* и *m. gastrocnemius medialis*) мышц. За неделю реадaptации на Земле не восстанавливается только масса *m. soleus*. В этом году исследовали содержание белка субстрата инсулиновых рецепторов -1 (IRS-1) и AMP-активируемой протеинкиназы (AMP-activated protein kinase (AMPK)) – участвующих в регуляции анаболического и катаболического сигнальных путей по принципу обратной связи, а также содержание E3-лигазы MURF-1 и элонгационного фактора eEF2 в *m. longissimus dorsi*. Формирования сигнального каскада с помощью IRS-1 и AMPK-зависимых сигнальных путей после 30 дней космического полёта уже не происходит. Работа IRS-1 –зависимого сигнального пути (регулируемого IGF-1) активизируется только в восстановительный период. Содержание убиквитин-лигазы MURF-1 после полёта увеличивается, однако после недельного периода восстановления её уровень достоверно не превышает контрольный.

Исследовали регуляцию кальпаинами 1 и 2 убиквитин-протеасомного пути деградации белков, а также анаболических Akt-mTOR-S6K и MAPK/Erk сигнальных путей при функциональной разгрузке мышц. Ингибировали кальпаины 1 и 2 в *soleus* крыс Wistar введением ингибитора PD150606 при 3х-дневном вывешивании животных (группа PD, n=7). Крысы, вывешенные без введения препарата составили группу В (n=7), 7 крыс служили виварным контролем (группа К). Обнаружено, что в *soleus* крыс группы PD (в отличие от крыс группы В) не наблюдалось: 1. атрофических изменений, увеличения уровня  $\mu$ -кальпаина и убиквитин-конъюгатов; 2. увеличения содержания мРНК атрогина-1 (но не MuRF-1) и eEF2k; 3. снижения уровня pAkt и pFOXO3. При этом содержание P-p90S6k в крыс группы PD было снижено так же, как и у крыс группы В (относительно группы контроля). Вывод: ингибирование кальпаинов 1 и 2 при разгрузке мышц приводит к изменению регуляции работы Akt-mTOR-S6K сигнального пути и eEF2-киназы (тормозящей синтез белка), что указывает на их роль в детерминации этих путей.

Работа выполнена на научном оборудовании, закупленном по Программе развития МГУ.

## Тема 8. Поиск новых подходов фармакологической коррекции нарушений, вызванных ишемией миокарда и мозга (руководитель – проф. Медведев О.С., кафедра фармакологии, лаборатория фармакологии сердечно-сосудистой системы)

На модели ишемии-реперфузии миокарда крыс установлено, что однократное внутривенное введение коэнзима Q10 до начала ишемии приводит к снижению частоты возникновения и длительности реперфузионных аритмий и ограничению на 30% зоны повреждения миокарда. К концу реперфузии уровни коэнзима Q10 в этих сердцах превышали значения контрольных крыс в 3 раза. Корреляционный анализ соотношения размера зоны некроза с содержанием коэнзима Q10 в миокарде показал, что большему содержанию коэнзима Q10 в миокарде соответствовал меньший размер зоны некроза ( $p < 0,001$ ). На модели необратимой ишемии миокарда крыс показано, что однократное внутривенное введение коэнзима Q10 в течение первого часа ишемии обеспечивает сохранение повышенных уровней коэнзима Q10 в плазме крови и миокарде на протяжении 21 дня, что сопровождается ограничением зоны некроза, постинфарктной гипертрофии желудочков, меньшим развитием систолической и диастолической дисфункции. Однократное внутривенное введение коэнзима Q10 через 180 мин. после необратимой окклюзии предотвращало развитие гипертрофии правого желудочка.

## Тема 9. Системные, клеточные и молекулярные механизмы функционирования организма в экстремальных условиях: микрогравитация и выполнение напряженных мышечных нагрузок (руководитель – академик РАН и РАМН Григорьев А.И., кафедра экологической и экстремальной медицины)

Гипертрофический эффект силовых физических упражнений связан с влиянием как механических, так и метаболических стимулов. При использовании упражнений в условиях ограниченного кровоснабжения работающих мышц, то есть в условиях, когда метаболические сдвиги усиливаются, тренировочный эффект достигается при использовании меньших внешних отягощений, чем при обычной силовой тренировке. При сопоставлении эффектов 8-нед обычной (80-85% МПС) силовой тренировки и тренировки с интенсивностью 50% МПС без расслабления работающих мышц обнаружено, что обычная тренировка приводит к несколько большему приросту силовых возможностей и размеров тренируемых мышц, чем тренировка без расслабления. При обычной тренировке происходит преимущественное увеличение площади, занимаемой на срезе мышцы мышечными волокнами II типа, а при тренировке без расслабления – волокнами I типа.

Упражнения без расслабления вызывают более выраженное увеличение секреции в кровь гормона роста, инсулиноподобного фактора роста-1 и кортизола. Силовая тренировка (50% МПС) без расслабления - эффективное средство для роста силы и гипертрофии мышц, которое может найти применение в практике спорта и физической культуры, как режим с относительно низкими нагрузками.

## Тема 10. Анализ изменений реологических свойств крови, гемодинамики при ишемических повреждениях тканей и их коррекции (руководитель – проф. Кошелев В.Б., кафедра физиологии и общей патологии)

Идентифицирован фрагмент hsERVPRODН, который действует как тканеспецифичный ген-усилитель для гена PRODН, необходимого для корректного функционирования ЦНС человека. PRODН считается ответственным за возникновение шизофрении и других неврологических расстройств у человека. Ген кодирует пролиндегидрогеназу, которая катализирует начальный этап катаболизма пролина, необходимый для синтеза нейромедиаторов в ЦНС. Исследовали механизмы регуляции активности гена-усилителя hsERVPRODН и показали, что в ней участвует метилирование. Ген-усилитель активирует экспрессию PRODН в гиппокампе. В механизме этого процесса есть стадия связывания hsERVPRODН с транскрипционным фактором SOX2, который экспрессируется главным образом в гиппокампе. Авторы полагают также, что взаимодействие этого фрагмента с геном PRODН участвует в эволюции ЦНС.

Работа выполнена на научном оборудовании, закупленном по Программе развития МГУ.

## Тема 11. Совершенствование диагностических возможностей томографии в онкологии (руководитель – д.ф.-м.н. Анисимов Н.В., лаборатория магнитной томографии и спектроскопии)

Проведены МРТ-исследования на лабораторных животных по глиальным опухолям и онкообразованиям. По полученным данным МРТ проанализирована эволюция глиальных опухолей (глиома С6) лабораторных крыс Wistar.

Недостаточная эффективность существующих методов лечения опухолей глиального ряда является следствием их быстрого инвазивного роста и отсутствия чётких границ опухоли при обычных нейровизуализационных исследованиях. В этой связи актуальным является разработка новых методов направленной диагностики и терапии, в том числе, основанных на применении молекулярных систем, селективных по отношению к очагу глиомы.

В рамках таких исследований была проанализирована динамика развития глиомы С6 у крыс Wistar. Для оценки общего объема зоны поражения использованы T2-взвешенные изображения в аксиальной проекции с толщиной среза 0,8 мм.

Глиома была спровоцирована введением клеточных штаммов в головной мозг животного. В рамках моделирования данного процесса на лабораторных животных ставилась задача за короткое время проследить развитие опухоли до весьма значительных размеров - даже больше объема головного мозга. Кроме того, были сделаны попытки управлять ростом глиомы за счет перераспределения количества клеток разных типов (CL1-4), определяющих степень злокачественности опухоли. Получено несколько графиков, показывающих динамику развития глиомы С6. Из них следует, что закон изменения не является линейным – на начальном этапе опухоль развивается менее быстрыми темпами, однако затем ее рост увеличивается в несколько раз. У отдельных особей отмечалось аномально быстрое развитие, которое было объяснено преобладанием опухолевых клеток типа CL4.

Для "взрывного" характера роста опухоли была предложена теория, согласно которой динамика роста опухоли определяется скоростью клеточного прироста без подключения сдерживающих факторов. Проведено сопоставление скорости роста объема глиальной опухоли с динамикой клеточного роста, описываемого в соответствии с рядом известных математических моделей.

Проведена апробация установки для газовой анестезии животных вместо ранее применявшейся внутримышечной инъекции.

## Тема 12. Спектроскопия ЯМР биологически активных метаболитов (руководитель – проф. Польшаков В.И., лаборатория магнитной томографии и спектроскопии)

В 2013 году проводилась работа по определению структурно-функциональных детерминант бета-амилоида болезни Альцгеймера. Методом ЯМР высокого разрешения в растворе определена структура серии патогенных мутантных форм металлсвязывающего домена бета-амилоидного пептида в комплексах с ионами цинка, определены центры хелатирования цинка, стехиометрия взаимодействия и

термодинамические параметры металл-пептидного взаимодействия. Координаты атомов димера пептида, содержащего патогенную «английскую» мутацию (H6R) с ионами цинка, были депонированы в международный банк белковых структур (код доступа 2MGT).

Продолжалось изучение фактора терминации трансляции eRF1 человека с целью определения вероятного механизма молекулярного узнавания стоп-кодонов мРНК. В 2013 году была отработана методика определения параметров химического обмена между двумя и более конформационными состояниями белка с помощью двумерных гетероядерных методов дисперсии релаксации (Relaxation Dispersion). Измерены параметры (скорости обмена и разница химических сдвигов двух форм) для N-домена eRF1 человека в свободном состоянии и в присутствии аденозина и гуанозина. Определены аминокислотные остатки, участвующие в конформационном обмене, индуцированном взаимодействием с азотистыми основаниями нуклеозидов.

Начата работа по созданию современных методик ЯМР-скрининга биологически активных соединений и их применению к поиску ингибиторов метионин- $\gamma$ -лиазы. Метионин- $\gamma$ -лиаза – фермент, присутствующий у серии патогенных микроорганизмов и отсутствующий в клетках человека, что определяет его перспективность в антибактериальной терапии. Отлажены импульсные программы ЯМР для проведения экспериментов по мониторингу белок-лигандных взаимодействий с использованием сигналов лигандов (STD, WaterLOGSY и т.п.). Эти эксперименты протестированы на образцах бычьего сывороточного альбумина с использованием смеси лигандов, для которых известны параметры их связывания с BSA. Тестовые образцы позволили определить оптимальные времена насыщения сигналов белка и воды, необходимую мощность радиочастотных импульсов и другие спектральные параметры, оптимальные соотношения концентраций лиганда и белка в смесях и т.п. Проведены также первые пробные эксперименты на образцах *C. freundii* метионин- $\gamma$ -лиазы, в результате которых удалось идентифицировать лиганды, способные связываться с ферментом. Для двух таких соединений, отобранных на основании экспериментов ЯМР, была подтверждена ингибирующая активность.

В 2013 году также начато исследование структуры в растворе двух аптамеров ДНК, обладающих высокой ингибирующей активностью по отношению к тромбину. Эти аптамеры, состоящие из 31 нуклеотидного остатка, имеют жесткую трехмерную структуру, скрепленную G-квартетами гуанильных остатков. Они связываются с тромбином с наномолярной константой диссоциации. Подобраны оптимальные условия отжига аптамеров ДНК с целью получения стабильных конформеров. Измерена серия спектров двумерных ЯМР и получено отнесение сигналов большинства нуклеотидных остатков. Рассчитана модельная структура одного из исследованных аптамеров. Эта структура будет далее уточняться в ходе дальнейших исследований.